

Polymorphismus von *Yersinia*
enterocolitica YscM2 und seine
Auswirkungen auf die
Oligomerisierung von YscM2 sowie
die Wechselwirkung mit dem
Chaperon SycH

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Tobias Kerrinnes
aus Halle an der Saale

1. Referent: Prof. Dr. Michael Steinert
2. Referent: Privatdozent Dr. Gottfried Wilharm
eingereicht am: 04.04.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am: 20.05.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Kerrinnes T. und Wilharm G.: Unravelling a polymorphism of *yscM2* in *Yersinia enterocolitica*. (Poster). 2. Nationale Yersinia Konferenz, Herrsching (2010).

Kerrinnes T. und Wilharm G.: Expression profile of *yscM1* and *yscM2* in *Yersinia enterocolitica*. (2008) *Int. J. Med. Microbiol.* 298, Suppl. 2, 76

Kerrinnes T. und Wilharm G.: *Y. enterocolitica yscM2* - redundancy revisited -. (Poster). 1. Nationale Yersinia Konferenz, Braunschweig (2007).

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	viii
Zusammenfassung	xi
1 Einleitung	1
1.1 Die Spezies <i>Y. enterocolitica</i>	1
1.2 Die klinischen Manifestationen einer Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i> .	4
1.3 Die Pathogenese von <i>Y. enterocolitica</i>	4
1.4 Virulenzdeterminanten von <i>Y. enterocolitica</i>	5
1.4.1 Chromosomal lokalisierte Virulenzdeterminanten	5
1.4.2 Plasmid-lokalisierte Virulenzdeterminanten	7
1.5 Die besondere Rolle der Regulatoren	
LcrQ/YscM1 und YscM2	14
1.6 Zielstellung	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien	20
2.1.2 Weitere Materialien	20
2.2 Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide	20
2.2.1 Bakterien	20
2.2.2 Vektoren und Plasmide	22
2.2.3 Oligonukleotide	22
2.3 Nährmedien, Kultivierung und Stammhaltung	23
2.3.1 Medien	23
2.3.2 Kultivierung	24
2.3.3 Stammhaltung	24
2.3.4 Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen .	25
2.4 Molekulargenetische Methoden	25

2.4.1	Isolierung, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA	25
2.4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.4.3	Einzelprimer-PCR (engl.: <i>single primer</i> PCR, spPCR)	27
2.4.4	Enzymatische Modifikation von DNA	27
2.4.5	Sequenzierung von DNA-Molekülen	28
2.4.6	Elektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	29
2.4.7	Transformation von DNA	29
2.5	Proteinbiochemische Methoden	30
2.5.1	Analyse der Yop-Sekretion	30
2.5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	31
2.5.3	Detektion von Proteinen	32
2.5.4	Immunochemischer Nachweis von Proteinen im Western Blot	33
2.5.5	Quantifizierung von Proteinen nach Bradford	34
2.5.6	Einengen von Proteinlösungen	34
2.6	Proteinexpression und Proteinreinigungen	34
2.6.1	Expression und Reinigung von SycH	34
2.6.2	Expression und Reinigung von YscM2 von <i>Y. enterocolitica</i>	36
2.7	Gelfiltration zur Bestimmung von Oligomerisierungszuständen von Proteinen	38
2.8	Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie	38
2.8.1	pH- <i>scouting</i>	39
2.8.2	Immobilisierung	39
2.8.3	Regenerierung	40
2.8.4	Kinetische Messungen am BiacoreX100	40
2.9	Kleinwinkelstreuanalysen	40
2.9.1	Ermittlung der Streukurven	41
2.9.2	<i>ab initio</i> Modellierung von Proteinen	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Der Polymorphismus von <i>yscM2</i> in klinischen Isolaten von <i>Y. enterocolitica</i> und dessen biochemische Charakterisierung	42
3.1.1	Prävalenz und Sequenzierung von <i>yscM2</i> in <i>Y. enterocolitica</i> Patientenisolaten	42
3.1.2	Gewinnung beider YscM2 Proteinisoformen	51
3.1.3	Die Oligomerisierung der YscM2 Isoformen	63
3.2	Herstellung und Aufreinigung von SycH aus <i>Y. enterocolitica</i>	65
3.3	Komplexbildung zwischen den YscM2 Varianten und SycH	69
3.3.1	Analytische Gelfiltration und native PAGE der Komplexe	69

3.3.2	Quantitative Betrachtung der Affinität von SycH zu den YscM2 Isoformen	75
3.3.3	Die Struktur von SycH und des SycH-YscM2-Komplexes in Lösung	79
4	Diskussion	85
4.1	Die Sequenzierung des <i>yscM2</i> Genes in Patientenisolaten von <i>Y. enterocolitica</i>	86
4.2	Die Auswirkungen des Genpolymorphismus von <i>yscM2</i> auf die Proteine YscM2 _{BT2-5} und YscM2 _{BT1B} von <i>Y. enterocolitica</i>	90
4.3	Die Oligomerisierung von SycH als Tetramer	94
4.4	Ausblick	98
	Literaturverzeichnis	100
	Danksagung	111

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Yersiniose in Deutschland	3
1.2	Pathogenese von <i>Y. enterocolitica</i>	6
1.3	Funktion der Effektoren von <i>Y. enterocolitica</i>	10
1.4	Das Typ-III-Injektionssystem von <i>Y. enterocolitica</i>	13
1.5	Strukturvergleich der Chaperone SycE, SycH und SycT von <i>Y. enterocolitica</i>	15
1.6	Modell der zellulären Funktion von LcrQ, YscM1 und YscM2	17
3.1	Duplex-PCR von <i>Y. enterocolitica</i> Patientenisolaten.	43
3.2	Verteilung der Biotypen in <i>Y. enterocolitica</i> Patientenisolaten im Zeitraum 2007 und 2008.	44
3.3	Ausrichtung der verwendeten Primer	45
3.4	Das <i>yscM2</i> Gen in <i>Y. enterocolitica</i> Patientenisolaten	46
3.5	Phylogenie des YscM2 Proteins	48
3.6	Polymorphismus der beiden YscM2 Sequenztypen	49
3.7	Klonierungsstrategie zur Expression der YscM2-RGSHis Fusionsproteine	52
3.8	Expressionskonstrukte synthetisiert durch Geneart	54
3.9	Expressionskonstrukt zur heterologen Expression der His ₆ YscM2 _{BT2-5} Isoform	56
3.10	Pilotexpression von His ₆ YscM2 _{BT2-5}	57
3.11	Affinitätsreinigung von His ₆ YscM2 _{BT2-5}	58
3.12	Subtraktive Abreicherung von His ₆ YscM2 _{BT2-5}	59
3.13	Übersicht zur Herstellung von His ₆ YscM2 _{BT2-5}	60
3.14	Expressionskonstrukt zur heterologen Expression der His ₆ YscM2 _{BT1B} Isoform	62
3.15	Elutionsprofil der His ₆ YscM2 Proteine auf PD10-Säulen	63
3.16	Oligomerisierung von His ₆ YscM2 _{BT2-5} und His ₆ YscM2 _{BT1B} in der Gelfiltration	65
3.17	Oligomerisierung der His ₆ YscM2 Isoformen im Western Blot	66
3.18	Lyse und (NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung von SycH	67
3.19	Aufreinigung von SycH	68

3.20	Die Aufreinigung von SycH im Western Blot	68
3.21	Gelfiltration von His ₆ YscM2 Isoformen und SycH allein und im Gemisch	70
3.22	Western Blot der Komplexe der His ₆ YscM2 Isoformen mit SycH in der Gelfiltration	72
3.23	Gemisch der His ₆ YscM2 Isoformen mit SycH in der nativen PAGE . .	74
3.24	Sensogramm der Wechselwirkung von SycH mit den His ₆ YscM2 _{BT2-5}	76
3.25	Die Affinitätskonstanten von SycH in der Wechselwirkung zu den His ₆ YscM2 Isoformen	77
3.26	Die Gestalt der His ₆ YscM2 _{BT1B} Isoform in Lösung	80
3.27	Dreidimensionale Darstellung von SycH und des Komplexes aus SycH und His ₆ YscM2 _{BT1B}	81
3.28	Die Kristallstruktur von SycH	82
3.29	Das atomare Modell des SycH-His ₆ YscM2 _{BT1B} Komplexes	84
4.1	Zelluläre Einbindung von YscM1 und YscM2 in <i>Y. enterocolitica</i> . . .	87
4.2	Lokalisation des <i>yscM2</i> Gens in Abhängigkeit des Biotypen von <i>Y.</i> <i>enterocolitica</i>	89
4.3	Das globuläre His ₆ YscM2 _{BT1B} Protein in Lösung	91
4.4	Größenvergleich von SycH in Lösung, im Kristall und einer Kombi- nation aus beiden Strukturen	96
4.5	Dreidimensionale Darstellung der Hülle des Komplexes aus SycH und His ₆ YscM2 _{BT1B}	97

Tabellenverzeichnis

1.1	Die Biotypen und Serotypen von <i>Y. enterocolitica</i>	2
2.1	Verwendete Bakterienstämme	21
2.2	Verwendete Vektoren und Plasmide	22
2.3	Verwendete Oligonukleotide	23
2.4	Antibiotika und weitere Medienzusätze	24
2.5	SDS-PAGE Gelkomposition	31
3.1	Gegenüberstellung der Aminosäurepositionen zwischen YscM2 _{BT2-5} und YscM2 _{BT1B}	50
4.1	Mögliche Stöchiometrien der Komplexe von SycH mit His ₆ YscM2 _{BT2-5} bzw. His ₆ YscM2 _{BT1B}	93

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua_{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
β-ME	β -Mercaptoethanol
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Carb	Carbenicillin
Cm	Chloramphenicol
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
engl.	englisch
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> , und andere
etc.	lat. <i>et cetera</i> , und so weiter
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde, Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
IMAC	engl. <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Km	Kanamycin

kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
lat.	latein
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min.	Minute, Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl. <i>polymerase-chain-reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pH	lat. <i>potentium hydrogenii</i>
PMF	engl. <i>proton motive force</i> , Protonen-motorische Kraft
pmol	Picomol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
REAC	<i>restriction endonuclease analysis of chromosome</i>
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde, Sekunden
S.	<i>Salmonella</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sh.	<i>Shigella</i>
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloracetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem

T3S	Typ-III-Sekretion
usw.	und so weiter
UTR	<i>engl. untranslated region</i> , nicht translatierter Bereich
V	Volt
vgl.	vergleiche
w/v	<i>engl. weight per volume</i> , Masse pro Volumen
w/w	<i>engl. weight per weight</i> , Masse pro Masse
Y.	<i>Yersinia</i>
Yop(s)	<i>engl. Yersinia outer protein(s)</i>
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Die humanpathogenen *Yersinia* Spezies *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* nutzen ein Typ-III- Sekretionssystem (T3SS), um Effektorproteine (Yops) in verschiedene Wirtszellen zu injizieren und so die Immunabwehr des Wirtes zu unterwandern. Ein wichtiger Regulator der Expression der *yop* Gene ist YscM1/LcrQ. Durch die Duplikation von *yscM1* besitzt *Y. enterocolitica* als einzige Spezies eine zweite Kopie des Gens, *yscM2*. YscM1 und YscM2 sind auf Proteinebene zu 57% identisch und nur die Deletion beider Gene führt zu einer Fehlregulation der *yop* Expression. Folglich wurde für beide Proteine eine funktionelle Redundanz postuliert. Um diese Annahme zu prüfen, sollte in dieser Arbeit die Stabilität des duplizierten *yscM2* Gens in *Y. enterocolitica* untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass *yscM2* in allen 140 untersuchten *Y. enterocolitica* Patientenisolaten der Biotypen 2 bis 5 erhalten war. Ein Vergleich der *yscM2* Gensequenzen von 32 repräsentativen Isolaten mit Referenzstämmen zeigte, dass alle klinischen Isolate und der Referenzstamm des Biotyps 2 einem spezifischen Sequenztyp (*yscM2*_{BT2-5}) angehören, während die Referenzstämmen des Biotyps 1B einen eigenen Sequenztyp (*yscM2*_{BT1B}) repräsentieren. Im Gegensatz dazu konnte für *yscM1* kein entsprechender Polymorphismus nachgewiesen werden. Die *yscM2* Sequenztypen kodieren für zwei YscM2-Isoformen (YscM2_{BT2-5} und YscM2_{BT1B}), die in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt wurden. In Gelfiltrationsanalysen erwies sich YscM2_{BT2-5} als Monomer-Dimer Gemisch und YscM2_{BT1B} als reines Monomer. Mittels Gelfiltration, Biacore und nativer Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass beide YscM2 Isoformen mit ihrem Chaperon SycH interagieren, was deren biologische Aktivität beweist. Allerdings besitzt die dimere Form von YscM2_{BT2-5} vermutlich keine Fähigkeit mit SycH zu komplexieren. Mit Röntgenkleinwinkelstreuanalysen konnte weiterhin die Molekülgestalt von YscM2_{BT1B}, SycH und deren Komplex ermittelt werden. Dabei erwies sich das SycH als Tetramer, was dem etablierten Modell eines Dimers widerspricht und zu einem neuen Modell der Chaperon-Effektor Wechselwirkung führt. Für *yscM2* konnte zusammenfassend eine von *yscM1* unabhängige Weiterentwicklung gezeigt werden, die in zwei funktionelle YscM2 Isoformen mündete. Die strikte Korrelation der YscM2 Isoformen mit phylogenetisch getrennten Biotypen bzw. Subspezies deutet auf eine Bedeutung von YscM2 für die unterschiedliche Ökologie dieser Gruppen hin.

1. Einleitung

"Der Tod kam per Schiff. Im Herbst 1347 legte er im Hafen von Messina an: Genuesen, die bereits ihre Festung auf der Halbinsel Krim aufgeben mussten, hatten die Pest an Bord. Schon wenige Tage nach ihrer Ankunft begann in der Stadt das große Sterben. Die Einwohner flohen in die Weinberge oder suchten Schutz im nahe gelegenen Catania. Tausende hofften, die dort aufbewahrten Reliquien der heiligen Agatha könnten ein Wunder vollbringen. Doch weder vermochten es ihre Gebete, noch waren die ängstlichen Nachbarn besonders willig, den Flüchtlingen zu helfen. Denn der Tod war ihr Begleiter." [53]

So, oder so ähnlich wie es in diesem Artikel aus der F.A.Z. vom 16. Oktober 2010 beschrieben ist, stellt sich das Bild der Gattung *Yersinia* oftmals dar. Wohl keine Region in Europa blieb von der Pest verschont und so ist das Bild der Gattung *Yersinia* bis heute im Allgemeinen von dem Erreger der Pest (*Yersinia pestis*) geprägt, der schließlich 1894 von Alexandre Yersin identifiziert wurde. Dennoch umfasst diese Gattung noch 14 weitere Spezies mit zwei für den Menschen bedeutsamen pathogenen Spezies: *Yersinia pseudotuberculosis* (*Y. pseudotuberculosis*) und *Y. enterocolitica* [68]. Obwohl bereits 1883 *Y. pseudotuberculosis* und im Jahre 1939 *Y. enterocolitica* beschrieben wurden, erfolgte ihre Zuordnung in die Gattung *Yersinia* und somit deren aktuelle Namensgebung als *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* erst Mitte der 1960er Jahre [69]. Beide Spezies werden durch orale Aufnahme von kontaminierter Nahrung aufgenommen und führen zu intestinalen Symptomen wie abdominalem Schmerz (besonders *Y. pseudotuberculosis*), Durchfall (besonders *Y. enterocolitica*) und Fieber [1]. Zwar sind beide Spezies im Vergleich zu *Y. pestis* in der Vergangenheit weit weniger prominent aufgefallen, dennoch sind *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* intensiv untersuchte Organismen, was nicht zuletzt daran liegt, dass beide bedeutende Modellorganismen für die molekulare Pathogenitätsforschung sind. In der vorliegenden Arbeit soll sich speziell der Spezies *Y. enterocolitica* zugewandt werden.

1.1 Die Spezies *Y. enterocolitica*

Die Erstbeschreibung des Bakteriums durch Schleifstein und Coleman geht auf das Jahr 1939 zurück [93]. Damals noch den Namen *Bacterium enterocoliticum* tra-

Tabelle 1.1: Die Biotypen und ihre häufigsten Serotypen bei pathogenen und nicht-pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen (erstellt nach Bottone *et al.* [13]).

	Biotyp	Serotyp
pathogen	1B	O:8; O:4; O13a,13b; O:18; O:20; O:21
	2	O:9, O:5,27
	3	O:1,2,3; O:5,27
	4	O:3
	5	O:2,3
nicht-pathogen bzw. opportunistisch	1A	O:5; O:6,30; O:7,8; O:18; O:46, nicht typisierbare Vertreter

gend, wurde die Spezies 1964 durch Frederiksen endgültig der Gattung *Yersinia* zugeordnet und in *Yersinia enterocolitica* umbenannt [35]. *Y. enterocolitica* ist ein Gram-negatives, nicht-sporulierendes Stäbchen, das bei Temperaturen unter 30°C begeißelt ist. Abhängig vom Medium variiert dessen Gestalt von klein und Koma-förmig bis zu langgestreckten Stäbchen [13]. Als natürliche Habitate kommen eine Vielzahl von ökologischen Nischen in Betracht. Dazu zählen klassische Umwelthabitate wie Boden und Wasser, aber auch für den Menschen bedeutsame Lebensräume wie Tierbestände (Haus- und Nutztiere aber auch Wildbestände, speziell kleinere Nager) und Nahrungsmittel (Milch, abgepacktes Fleisch, Gemüse, Eier, Käse, etc.). Die Persistenz in Tierbeständen und die wechselseitige Übertragung zwischen Tier und Mensch klassifiziert *Y. enterocolitica* als typischen Zoonoseerreger [36]. Aufgrund von Stoffwechselleistungen (Verwertung bestimmter Zucker, Nitratreduktion oder Indolproduktion) kann die Spezies *Y. enterocolitica* biochemisch in sechs Biotypen eingeteilt werden (Biotyp 1A, 1B, 2, 3, 4 und 5) [118]. Dabei sind die Biotypen 1B, 2 - 5 mit Krankheitsausbrüchen assoziiert, die durch *Y. enterocolitica*- Infektionen verursacht werden. Die Rolle von Biotyp 1A Stämmen bei der Manifestation von *Y. enterocolitica* Infektionen wird hingegen noch diskutiert. Auf Grund des Fehlens von wichtigen Virulenzdeterminanten gelten diese Biotyp 1A Stämme als apathogen oder zumindest als opportunistisch [9, 13]. Mit Hilfe von serologischen Reaktionen wird die Spezies in 60 Serotypen unterteilt, von denen 11 gehäuft bei humanen *Y. enterocolitica* Infektionen auftreten [13]. Da die Serotypen in unterschiedlichen *Yersinia* Biotypen vertreten sein können, wird für die Bewertung des pathogenen Potentials eines *Y. enterocolitica* Isolates immer eine Kombination aus Biotyp und Serotyp angegeben. Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die Biotypen, die 11 wichtigsten Serotypen und deren pathogenes Potential wieder.

Basierend auf ihrem pathogenen Potential werden *Y. enterocolitica* Biotypen auch in hoch- und gering-pathogene *Y. enterocolitica* Stämme unterteilt. Dabei gelten die vorwiegend in den USA vorkommenden *Y. enterocolitica* Biotyp 1B Stämme

als hoch-pathogen, während die weltweit verbreiteten *Y. enterocolitica* Stämme der Biotypen 2 - 5 als gering-pathogen bezeichnet werden [48, 7]. Aus genetischer Sicht beruht diese Differenzierung auf der Aufnahme von zusätzlichem genetischen Materials durch *Y. enterocolitica* Stämme des Biotypen 1B. Insbesondere die Aufnahme einer chromosomalen Pathogenitätsinsel (*high pathogenicity island*, HPI) und eines Typ-II-Sekretionssystems gelten dabei als ausschlaggebend [121]. Die hoch-pathogenen Stämme sind bereits in niedrigen Infektionsdosen für Mäuse lethal und sind häufiger mit systemischen Krankheitsverläufen beim Menschen assoziiert. Im Gegensatz dazu sind die gering-pathogenen *Y. enterocolitica* Stämme der Biotypen 2-5 nicht lethal für Mäuse und führen auch beim Menschen eher zu milden Durchfallerkrankungen. In Deutschland ist die Yersiniose eine meldepflichtige Krankheit. Dadurch stehen aktuelle Fallzahlen zur Verfügung, die zeigen, dass die Infektionen mit Biotyp 1B *Y. enterocolitica* Stämmen eine geringe Bedeutung haben. Im Jahr 2002 wurde erstmals ein Fall einer solchen Yersiniose in Deutschland beschrieben [55]. Hingegen zählt die Yersiniose durch die Biotypen 2-5 zu den häufigeren enteralen Infektionen in Deutschland, wenn auch mit sinkenden Fallzahlen (siehe Abbildung 1.1).

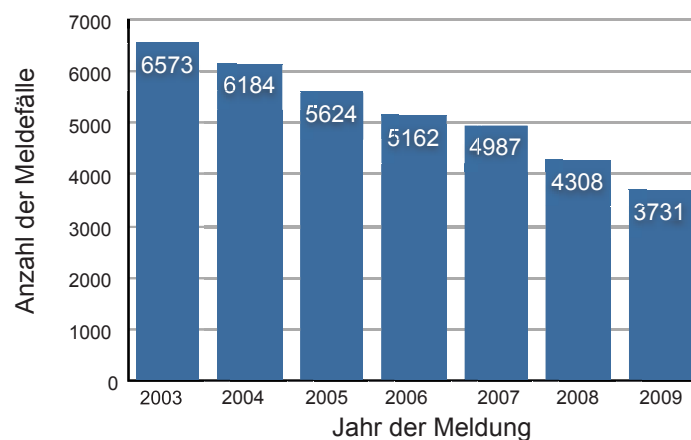


Abbildung 1.1: Übersicht zu den gemeldeten Infektionen mit *Y. enterocolitica* in Deutschland zwischen 2003 und 2009. Mit 3731 gemeldeten Fällen ist diese Infektion die vierthäufigste bakterielle Enteritis [2, 3].

Zusätzlich wird die Spezies *Y. enterocolitica* seit dem Jahr 2001 auf Grund von Unterschieden in den Sequenzen der 16s rRNA Gene in zwei Subspezies unterteilt. Danach werden die hoch-pathogenen Biotyp 1B *Y. enterocolitica* Stämme als *Y. enterocolitica* Subspezies (subsp.) *enterocolitica* bezeichnet und die gering pathogenen *Y. enterocolitica* Stämme der Biotypen 1A, 2 - 5 als *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica*. In einem Vergleich der Gesamtgenome von apathogenen, gering-pathogenen und hoch-pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen konnte gezeigt werden, dass das

gemeinsame Kerngenom aller *Y. enterocolitica* Stämme nur bei 20.8% aller Gene lag [48]. Dies untermauert nochmals die Diversität der Spezies *Y. enterocolitica*.

1.2 Die klinischen Manifestationen einer Infektion mit *Y. enterocolitica*

Durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln, vor allem Schweinefleisch, kann es zum Ausbruch einer Yersiniose kommen [36]. Generell können zwei Verlaufsformen beobachtet werden: die häufigste Form ist eine Enteritis oder Enterokolitis, wesentlich seltener zeigt sich ein systemischer Verlauf. Die Enteritis verläuft oft selbst limitierend mit spontaner Heilung, während der systemische Verlauf lebensbedrohende Ausmaße annehmen kann [95, 46]. Im Fall der Enteritis bzw. Enterokolitis beträgt die Inkubationszeit durchschnittlich drei bis zehn Tage. Die Enteritis zeigt sich häufig in klinischen Symptomen wie Fieber, abdominalem Schmerz und Durchfall [40]. Generell sind alle Altersgruppen betroffen, Kinder unter sechs Jahren scheinen sich jedoch tendenziell häufiger zu infizieren [3]. Infizieren sich ältere oder immungeschwächte Patienten mit *Y. enterocolitica*, so kann die Infektion einen systemischen Verlauf ausbilden, was zu einer Bakteriämie und später zu einer schweren Septikämie führen kann. Dabei zählen neben Alter und einer Immunschwäche auch Diabetes, Lungenentzündung und Leberzirrhose als begünstigende Faktoren. Sehr selten, aber umso verheerender ist die Übertragung von *Y. enterocolitica* durch kontaminierte Blutkonserven, die zu einer fulminanten Septikämie führen kann [59]. In der Diagnostik des Erregers steht immer noch der serologische Nachweis einer Infektion im Vordergrund. Des Weiteren stehen für die Anreicherung und Identifizierung des Erregers aus dem Patientenmaterial mehrere Anreicherungsmedien, wie CIN - oder ITC-Agar zur Verfügung [1], welche durch eine Sekundärdiagnostik basierend auf Bio- und Serotypisierung kombiniert mit molekularen Methoden (z.B. PCR, REAC, PFGE etc.) unterstützt wird [36]. Da oft eine spontane Heilung von Yersiniosen beobachtet wird, werden nur bei Risikopatienten, Septikämien und anderen Komplikationen Antibiotika entsprechend der Resistenzlage des Erregers eingesetzt [46].

1.3 Die Pathogenese von *Y. enterocolitica*

Betrachtet man den Verlauf einer Infektion mit *Y. enterocolitica*, kann man einen ausgeprägten Tropismus zum lymphatischen System erkennen [40]. Nach oraler Aufnahme und Magenpassage besiedelt *Y. enterocolitica* das untere Ileum und gelangt über M-Zellen des Follikel-assoziierten Epithels zur basolateralen Seite des Darmepithels, wo der Erreger mit den Makrophagen und dendritischen Zellen der Peyer-Plaques in Kontakt tritt. Die in der Frühphase der Infektion essentielle Adhärenz des

Erregers an die M-Zellen wird durch das Adhäsionsprotein Invasin vermittelt. Das Invasin wird durch *Y. enterocolitica* auf der Zelloberfläche exprimiert und bindet an die membranständigen β 1-Integrine der M-Zellen. Die Bindung ist Voraussetzung für die als Transzytose bezeichnete Translokation des Erregers auf die basolaterale Seite der M-Zellen und des Darmepithels [39]. Dabei kommt es durch die Zellen des Epithelgewebes zur Sezernierung von Chemokinen, was zum massiven Einstrom von Granulozyten führt. Durch die massive Präsenz der Granulozyten kommt es am Ort der Infektion zu Gewebszerstörungen und der Bildung von Abszessen [8]. Das erleichtert *Y. enterocolitica* wiederum den Zugang in das basolaterale Gewebe inklusive der Peyer-Plaques. Innerhalb der Peyer-Plaques wird nun ein weiteres Oberflächenprotein benötigt. Dabei handelt es sich um das Protein YadA, das im Gegensatz zum Invasin erst bei 37°C exprimiert wird. Es vermittelt nun die Adhärenz an Makrophagen und dendritische Zellen. Einmal adhäriert, erfolgt über ein zuvor aktiviertes Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) die Translokation von Effektorproteinen in das Zytoplasma der Phagozyten, wodurch die Makrophagen an der Phagozytose des Erregers gehindert werden. Weiterhin kommt es zur Apoptose der Makrophagen, sowie einer Unterdrückung der B- und T-Zellaktivierung. Dies führt zur Manifestation der *Y. enterocolitica* Infektion begleitet von der Verbreitung des Erregers in Geweben und Organen. Lymphknoten, Milz und Leber sind hierbei besonders betroffen [111, 8]. Eine grafische Darstellung des Infektionsverlaufes einer Yersiniose ist in Abbildung 1.2 zu sehen.

1.4 Virulenzdeterminanten von *Y. enterocolitica*

Zum Repertoire der Virulenz-vermittelnden Eigenschaften zählen bei *Y. enterocolitica* sowohl plasmidale als auch chromosomale Virulenzdeterminanten. Im Allgemeinen gelten die Plasmid-kodierten Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* als essentiell für die Pathogenese des Erregers, dennoch können diese Faktoren nicht den vollen Umfang der Virulenz von *Y. enterocolitica* erklären [81]. Zwar unterscheidet die Anwesenheit des Virulenzplasmides (pYV) pathogene (Biotyp 1B, 2 - 5) und nicht-pathogene *Y. enterocolitica* Stämme (Biotyp 1A), die Existenz der chromosomal lokalisierten *high pathogenicity island* (HPI) ist jedoch für die Virulenzausprägung der hoch-pathogenen *Y. enterocolitica* Biotyp 1B Stämme notwendig [21].

1.4.1 Chromosomal lokalisierte Virulenzdeterminanten

In den letzten Jahren wurde der Bedeutung der chromosomal lokalisierten Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* immer größere Beachtung geschenkt. Dies schlägt sich in der ständig wachsenden Zahl der potentiellen chromosomalen Virulenzgene nieder. In einer Arbeit aus dem Jahr 2001 wurden etwa 24 solcher potentieller Loci vorgeschlagen [81]. Unumstritten ist die Rolle der bereits erwähnten HPI für die

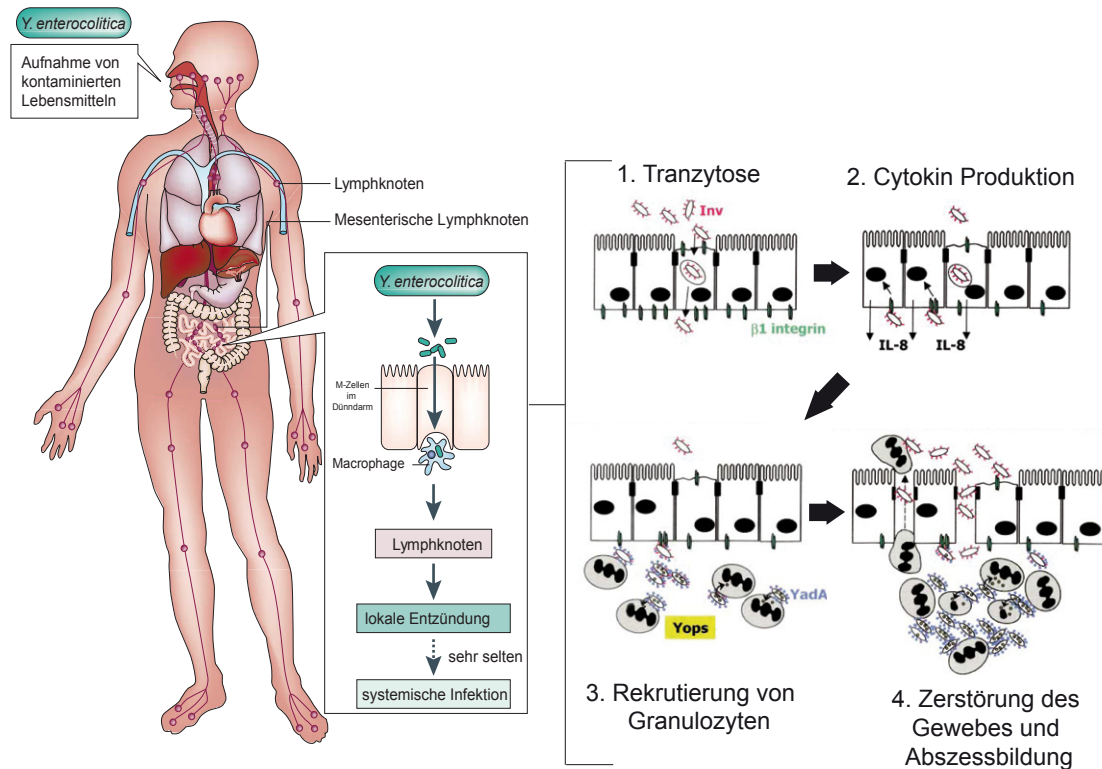


Abbildung 1.2: Die Pathogenese von *Y. enterocolitica*. Dargestellt ist der Infektionsweg von *Y. enterocolitica* nach der Aufnahme durch kontaminierte Lebensmittel. Nach oraler Aufnahme und Magenpassage befällt *Y. enterocolitica* das untere Ileum und gelangt über M-Zellen zu den Makrophagen und dendritischen Zellen der Peyer-Plaques. Der Übergang ins basolaterale Gewebe wird durch die Interaktion des *Y. enterocolitica* Invasins InvA mit dem Oberflächenrezeptor der M-Zellen ($\beta 1$ -Integrin) realisiert. Diese Interaktion führt ebenso zur Sezernierung von Chemokinen (IL-8), was unter anderem Granulozyten anlockt. Der massive Einstrom von Granulozyten führt in der Folge zu Gewebszerstörungen und Abszessen. Das erleichtert den Zustrom von *Y. enterocolitica* in das infizierte Gewebe. Durch die YadA-vermittelte Adhärenz an Makrophagen und der Translokation von Effektoren (Yops) über ein aktiviertes T3SS werden die Makrophagen an der Phagozytose der Yersinien gehindert. Dabei kommt es zum Zelltod der Makrophagen und zum Unterdrücken von immunologischen Prozessen. Anschließend erfolgt die Vermehrung und Verbreitung von *Y. enterocolitica*, was zu einer systemischen Infektion führen kann. Die Zeichnung wurde nach [39, 40, 121] modifiziert.

Virulenz von *Y. enterocolitica* [44, 21]. Die HPI zeigt den Aufbau einer klassischen Pathogenitätsinsel und kodiert für ein zusätzliches Eisenaufnahmesystem, dem Yersiniabactin [21]. Auf die Rolle des ebenfalls chromosomal kodierten Invasins (*inv*) wurde im Abschnitt 1.3 zur Pathogenese von *Y. enterocolitica* bereits näher eingegangen. Ebenfalls von Interesse ist der Regulator des *inv* Gens selbst, das RovA Protein. In den Arbeiten zum Invasin konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des Gens zwar in der Frühphase der Infektion zu Beeinträchtigungen in der Etablierung

der Infektion führt, aber die Disseminierung in tiefere Gewebe nicht behindert wird. Betrachtet man die Infektion nach 4 Tagen im Vergleich zwischen *inv*-Mutante und dem Wildtyp erkennt man keinen Unterschied zwischen den beiden Stämmen [73]. Im Gegensatz dazu hat eine Mutante des *inv*-Regulators RovA wesentlich gravierendere Auswirkungen auf die Virulenz. Eine *rovA*-Mutante kann zwar die Peyer-Plaques besiedeln, disseminiert aber nicht mehr in tiefere Gewebe. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass RovA nicht an der Regulation von plasmidalen Virulenzfaktoren beteiligt ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass weitere chromosomale Virulenzfaktoren an der Etablierung der Infektion mit *Y. enterocolitica* beteiligt sein müssen [81].

1.4.2 Plasmid-lokalisierte Virulenzdeterminanten

Vor etwa 30 Jahren wurde durch die Arbeiten von Zink *et al.* ein richtungsweisender Schritt in der Erforschung der molekularen Pathogenese von *Y. enterocolitica* vollzogen. Der Grund war die Beschreibung eines Plasmids, das für die Etablierung der Infektion durch *Y. enterocolitica* essentiell ist [125, 44]. Dieses 70 kDa große Plasmid (pYV, *Yersinia* yirulence) ist hauptverantwortlich für die Pathogenität der enteropathogenen Spezies *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, aber auch für *Y. pestis* [121, 1, 44]. Es kodiert für ein Typ-III-Sekretionssystem (Injektisom, T3SS), ein zugehöriges Set von sieben Effektorproteinen (*Yersinia* outer proteins): YopE, YopP, YopT, YopH, YopO, YopQ und YopM), Translokatoren (YopB, YopD und LcrV), spezifische Faltungshelfer (Chaperone) und das Adhäsिन YadA (*Yersinia* Adhäsिन A). Die Gene für das Injektisom sind in vier Operonen organisiert, welche als *virA*, *virB*, *virC* und *virG* bezeichnet sind. Das T3SS ist für die sogenannte Mikroinjektion der Yops in die Wirtszelle verantwortlich. Die Expression der plasmidalen Virulenzfaktoren wird hauptsächlich durch die Umgebungstemperatur und den Transkriptionsregulator VirF reguliert. VirF, welcher selbst auf dem pYV-Plasmid kodiert ist, wird erst bei einer Temperaturerhöhung auf 37°C exprimiert. Durch die hohe Temperatur werden außerdem Bereiche der Promotoren der Virulenzgene aufgeschmolzen, was diese erst für die Bindung durch VirF zugänglich macht [85, 49].

1.4.2.1 Das *Yersinia* Adhäsिन A (YadA)

Neben den Fimbrien stellen das chromosomal lokalisierte Invasin und das Plasmid-kodierte *Yersinia* Adhäsिन A (YadA) die beiden wichtigsten Adhäsine für die Enteropathogenität von *Y. enterocolitica* dar. Die Aufgabe von YadA ist es, nach der Invasion von *Y. enterocolitica* in die Peyer-Plaques die Bildung von lokalen Anhäufungen von *Y. enterocolitica* und eine Adhärenz an Makrophagen und andere Zellen des Immunsystems zu vermitteln [44]. YadA gehört zur Klasse der Autotransporter und bildet ein Homotrimer aus ca. 45 kDa Untereinheiten, die über ihre C-Termini in der äußeren Membran verankert sind. Die N-Termini bilden eine kugelige Kopf-

struktur auf einem Stengel, was den YadA Trimeren ihre typische Lollipop-artige Struktur verleiht. YadA wird auf der gesamten Bakterienoberfläche exprimiert, was dieser hydrophobe Eigenschaften verleiht. Das Protein YadA ist ein vielseitig einsetzbarer Virulenzfaktor für *Y. enterocolitica*. Es bindet unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Kollagene, Laminin, Fibronektin, intestinale Submucosa) [84]. Es vermittelt Serumresistenz, indem es die Opsonisierung des Erregers durch C3b des Komplementsystems verhindert [23]. Durch die Bindung von YadA an die β 1-Integrine der Wirtszellen kommt es zur Ausbildung eines funktionellen Injektisoms [32].

1.4.2.2 Die Effektoren des Typ-III-Sekretionssystems, die *Yersinia* Outer Proteins (Yops)

Y. enterocolitica benötigt neben einem aktivierten Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) ein Set von Effektorproteinen, um im lymphatischen Gewebe des Wirtes zu replizieren und sich den Attacken des Immunsystems zu entziehen. Derzeit sind sieben Effektorproteine für *Y. enterocolitica* bekannt: YopE, YopH, YopM, YopO, YopP, YopQ und YopT. Alle werden über ein aktives T3SS in verschiedene Wirtszellen transloziert, um dort zwei grundlegende Prozesse zu beeinflussen: (i) das wirtszelluläre Zytoskelett, welches die Phagozytose der Yersinien vermittelt und (ii) Signalkaskaden, welche die Immunantwort aktivieren [109]. Diese Manipulation erreichen die Yops, indem sie die Funktionen von wichtigen Faktoren im Netzwerk der Signalverschaltung der Wirtszelle nachahmen, ein Prinzip, welches auch als molekulare Mimikry bezeichnet wird. Zwei Eigenschaften sind für alle Yops gleich: ihre Expression wird erst nach dem Kontakt von *Y. enterocolitica* mit einer Wirtszelle vollständig aktiviert und sie enthalten ein N-terminales Sekretionssignal, das nach dem Transport nicht abgespalten wird [75, 101]. Obwohl die Yops biochemisch gut charakterisiert sind, bleibt ihre geordnete Translokation in den Wirtsorganismus immer noch ungeklärt [109].

Das **YopH** Protein ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTPase). Im N-Terminus des Proteins befindet sich neben dem Sekretionssignal die Binde- und Erkennungsdomäne für phosphorylierte Tyrosine und im C-Terminus befindet sich das katalytische Zentrum für die Phosphatase-Aktivität. Die katalytische Aktivität von YopH inhibiert verschiedene Signalkaskaden, was zur Verhinderung der Phagozytose durch die Wirtszellen und zur Eindämmung von Phagozytose-begleitenden Prozessen wie dem Ausstrom von reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: *oxidative burst*) durch Makrophagen und Neutrophile beiträgt. Hauptziel der PTPase-Aktivität von YopH sind die Bestandteile der fokalen Adhäsions-Komplexe, wie zum Beispiel p130^{Cas}, FAK und Paxillin. Diese Komplexe übertragen die Aktivierung der membranständigen β 1-Integrine durch das *Y. enterocolitica* Invasin an das Zellzytoskelett weiter, was die Internalisierung von *Y. enterocolitica* zur Folge hätte. Durch die Dephosphory-

lierung (PTPase-Aktivität) der Hauptkomponenten wird dieser Prozess verhindert [114, 97].

YopE bindet kleine G-Proteine der RhoA-Familie und aktiviert deren intrinsische GTPase-Domäne. Das führt zu einer Hydrolyse des gebundenen GTPs und somit zur Inaktivierung des Proteins. Die Aktivität der G-Proteine führt zur Aktivierung von Signalkaskaden, welche die Assemblierung des Zytoskeletts einleiten. Diese Assemblierung ist eine wichtige Voraussetzung für die Phagozytose der Yersinien durch die Wirtszelle. Letztendlich bleibt durch die Aktivität von YopE die Aktivierung dieser G-Protein vermittelten Signalkaskaden aus und eine Phagozytose wird verhindert [114]. Ähnlich wirkt sich die Aktivität von **YopT** aus. YopT ist eine Papain-ähnliche Cystein Protease welche Prenylgruppen am C-Terminus von G-Proteinen abspaltet [97]. Auf Grund dessen verlieren die G-Proteine ihre Verankerung in der Wirtszellmembran und werden delokalisiert, was zu deren Inaktivierung führt.

Die Phagozytose von *Y. enterocolitica* wird ebenso durch das Multidomänen Protein **YopO** verhindert. Der N-Terminus beherbergt eine Serin/Threonin-Kinase Domäne und der C-Terminus vereinigt sowohl die Funktion eines Nukleotid-Dissoziations-Inhibitors (GDI) als auch die einer Aktin-bindenden Domäne. Vermittelt durch die Serin/Threonin-Kinase Aktivität verhindert YopO die Aktivierung einer Unterfamilie der G-Proteine ($G\alpha_q$). Durch die GDI-Funktion von YopO wird der Austausch von GDP zu GTP in diesen G-Proteinen verhindert und diese somit dauerhaft in einen inaktiven Zustand überführt. In der Folge werden auch hier wieder Rho-abhängige Signalkaskaden inhibiert [79, 70].

YopP ist eine Acetyltransferase, welche ein starker Inhibitor der MAP-Kinase-Kinase Superfamilie (MAPKK) und der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalkaskade ist [89]. Diese Aktivität beruht auf der Fähigkeit von YopP, Serin- und Threoninreste zu acetylieren, was zur Inhibierung von zahlreichen Kinasen in der Wirtszelle führt. Im Ergebnis wird die Induktion der Cytokin-Produktion verhindert und die Apoptose von Makrophagen und Dendritischen Zellen aktiviert [114, 89].

Der einzige Effektor, der nach heutigem Erkenntnisstand nicht für eine enzymatische Funktion kodiert ist YopM. Das **YopM** Protein zeigt eine besondere Struktur, denn es beinhaltet eine variable Anzahl von Leucin-reichen Wiederholungen, die eine typische Hufeisen-förmige Grundstruktur des Moleküls vorgeben. YopM bildet ein zylindrisches Homotetramer mit einem inneren Durchmesser von 3.5 nm [114, 33]. Das Protein besitzt in seinem C-Terminus ein Lokalisierungssignal für den Zellkern und wird über einen Mikrotubuli-assoziierten Vesikeltransport in den Zellkern der Wirtszelle transportiert, wo es vermutlich an der Regulation der Genexpression beteiligt ist [98]. Es konnte gezeigt werden, dass YopM als Adapterprotein zwischen den beiden zytoplasmatischen Kinasen RSK1 und PRK2 dient. Dadurch werden beide Kinasen aktiviert. Dennoch ist die Funktion des RSK1-YopM-PRK2 Komplexes in der Wirtszelle unbekannt [114]. Zusammenfassend besteht die Funktion von

YopM in der Beeinflussung der angeborenen Immunantwort. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Aktivität von YopM zur Depletion von NK-Zellen führt [54]. Einen sehr spannenden Befund erbrachte die Arbeit von Rüter *et al.*, welche zeigte, dass YopM ohne die Hilfe von weiteren Faktoren, also vollkommen autonom, über die Zellmembranen verschiedener Zelltypen translozieren kann und dass diese Funktion im N-Terminus des Proteins kodiert ist [90].

YopQ wird ebenfalls durch ein aktives T3SS in die Wirtszelle transloziert [37]. Es konnte gezeigt werden, dass YopQ die Größe der Translokationspore beeinflusst [106]. Des Weiteren interagiert YopQ im Wirtszellzytosol mit den Proteinen der Translokationspore und inhibiert so deren Erkennung, was letztendlich die Ausbildung des Inflammasoms und die Aktivierung der Caspase-1 verhindert [15]. Abbildung 1.3 fasst die Aktivitäten der Effektoren am Beispiel einer Interaktion von *Y. enterocolitica* mit einem Phagozyten exemplarisch zusammen.

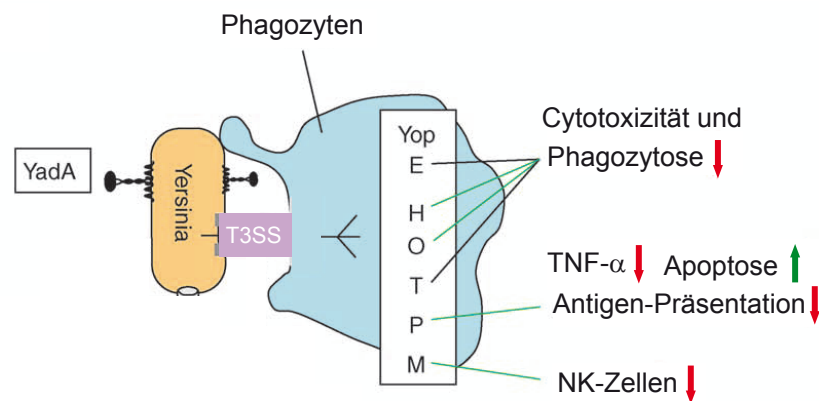


Abbildung 1.3: Übersicht über die Auswirkungen der Yop-Aktivitäten im Wirtszellzytosol. Das Plasmid kodierte YadA dient der Aktivierung des T3SS und ist ein multifunktionelles Protein zur Bindung verschiedener extrazellulärer Proteine. Die Effektoren werden über ein aktiviertes T3SS in die Wirtszelle transloziert. Im Wirtszellzytosol werden durch die GTPase-Aktivität von YopE, YopT und YopO Rho-abhängige Signalkaskaden inhibiert und das Zytoskelett der Wirtszelle der Art beeinflusst, dass die Phagozytose unterbunden wird. Durch die beiden Effektoren YopP und YopM wird die Entwicklung einer Immunantwort als Reaktion des Wirtes auf die Infektion mit *Y. enterocolitica* unterdrückt. Die Zeichnung wurde der Publikation von Heesemann *et al.* entnommen und modifiziert [44].

1.4.2.3 Das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS)

Am Beispiel von YopE konnte gezeigt werden, dass die bloße Sezernierung des Effektors in den Kulturüberstand keine Auswirkungen auf die eukaryotische Wirtszelle hat. Versetzt man eukaryotische Zellen mit sekretierten und aufgereinigten YopE, so hat das keinerlei Effekte auf die Integrität der eukaryontischen Zelle. Erst eine Translokation von YopE in das Zytosol zeigt das typische Abrunden der infizierten

Zellen (Cytotoxizität) [86]. Für die Translokation der Effektoren aus dem bakteriellen Zytoplasma in das Wirtszellzytoplasma bedient sich *Y. enterocolitica* spezieller molekularer Injektionskanülen. *Y. enterocolitica* exprimiert etwa 50 bis 100 solcher molekularer Nadeln, die als Typ-III-Sekretionsapparat (T3SS) bezeichnet werden [47, 28]. Das T3SS ist ein Transportsystem, das die innere und äußere bakterielle Membran durchspannt und durch eine steife Nadel abgeschlossen wird. Aufgrund dieser Nadelstruktur wird das T3SS auch als Injektisom bezeichnet. Das gesamte Organell wird durch vier Operons (*virA*, *virB*, *virC* und *virG*) auf dem pYV Plasmid kodiert und umfasst etwa 27 Proteine. Die Expression aller Gene des Injektisoms erfolgt temperaturabhängig bei 37°C [47]. Der basale Teil, welcher als Basalkörper bezeichnet wird, beinhaltet 9 Proteine, die einen hohen Verwandtschaftsgrad zu den Proteinen des Basalkörpers von Flagellen aufweisen. Deshalb wird spekuliert, dass es einen gemeinsamen Vorläufer geben könnte [28, 25]. Bislang sind Strukturen des Basalkörpers des T3SS nur aus *Shigella flexneri* und *S. Typhimurium* bekannt. Aufgrund der sehr hohen Verwandtschaftsgrade zwischen den Proteinen kann man jedoch die Erkenntnisse aus den elektronenmikroskopischen Analysen der T3S-Apparate von *Salmonella* und *Shigella* auf das *Y. enterocolitica* Injektisom übertragen. Daraus ergibt sich für den Basalkörper des T3SS eine zylindrische Struktur aus drei Ringen, die die beiden Membranen durchspannen. Sie formen einen Kanal von 2-3 nm Länge, der den basalen Bereich durchspannt [12]. Die Ringe der inneren Membran werden von den Proteinen YscJ und YscD gebildet. YscJ bildet auf der periplasmatischen Seite der inneren Membran einen Ring aus ca. 24 Untereinheiten und ist über eine C-terminale Transmembranhelix und einen N-terminalen Lipidrest in der inneren Membran verankert [123]. Der zweite Ring in der inneren Membran wird von YscD gebildet, welches über eine einzelne Transmembranhelix in der Membran verankert ist und den Ring aus YscJ umschließt [102]. Das Sekretin YscC, welches den Ring in der Außenmembran bildet, ähnelt jenen Proteinen, die Bakteriophagen benutzen, um in ihrer lytischen Phase die Wirtszelle zu verlassen. YscC formt einen Ring aus 12-14 Untereinheiten mit einer Gesamtmasse von 1 MDa. Dieser Ring mit einem äußeren Durchmesser von 20 nm durchspannt das Peptidoglykan und die äußere Membran [17]. Die Oligomerisierung und die Einlagerung des Sekretinringes wird durch das Lipoprotein YscW (auch als Pilot bezeichnet) begleitet, das selbst in der äußeren Membran verankert ist [16, 25].

Ein weiterer Bestandteil des Basalkörpers ist der Exportapparat, welcher aus den Proteinen YscR, YscS, YscT, YscU und YscV besteht und in der inneren Membran lokalisiert ist [25]. Die genaue Ausrichtung und Stöchiometrie der Komponenten des Exportapparates ist bislang noch nicht verstanden. Auf der zytosolischen Seite der Bakterienmembran wird der Basalkörper wahrscheinlich durch einen cytoplasmatischen Ring (C-Ring), bestehend aus Einheiten des Proteins YscQ, abgeschlossen [66]. Über Wechselwirkungsstudien (*Yeast two-hybrid system*) konnte gezeigt werden, dass dieser C-Ring mit der ATPase YscN interagiert [51]. Die ATPase dient

vermutlich zum Einen der Energetisierung der Typ III Sekretion und zum Anderen der Auflösung von Chaperon-Effektor Komplexen und der anschließenden Entfaltung der Effektoren zum Zwecke des Transports durch das Injektisom. Diese Prozesse werden durch die Hydrolyse von ATP begleitet [5]. Zusätzlich interagiert YscQ mit dem Protein YscL, das wiederum in Wechselwirkung mit der ATPase (YscN) steht [11]. Ein weiteres Protein, das mit der ATPase interagiert ist YscK. Dessen genaue Funktion konnte bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden, aber vermutlich dient es als generelles Chaperon [51]. Aus dem Basalkörper, der die bakteriellen Membranen durchspannt, ragt die eigentliche T3-Nadel heraus. Die T3-Nadel besitzt, ebenso wie das bakterielle Flagellenfilament, eine helikale Grundstruktur und wird bei einer Länge von ca. 58 nm und einem inneren Durchmesser von ca. 2.5 nm aus 100-150 Untereinheiten des 6 kDa großen YscF Proteins aufgebaut [25]. Die Länge der Nadel wird durch das Protein YscP bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass artifizielle Verkürzungen oder Verlängerungen von YscP zu entsprechend kürzeren und längeren Nadeln führen. Aus diesen Experimenten wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem das YscP Protein ein molekulares Maßband für die Nadellänge darstellt [52]. Die Spitze der Nadel bilden mehrere LcrV-Moleküle. Das LcrV Protein gehört mit den beiden Poren-bildenden Proteinen YopB und YopD zur Familie der Translokatoren. YopB und YopD sind zwei hydrophobe Proteine, die sich in die Wirtszellmembran integrieren und dort eine Pore formen. Das eigentliche Andocken der Nadel an die Translokationspore wird über die Wechselwirkung zwischen YopB-D und LcrV vermittelt [67]. Abbildung 1.4 gibt noch einmal eine Übersicht über die Gestalt und den Aufbau des Typ-III-Sekretionsapparates [12, 25].

Die Erkennung, Entfaltung und der Transport der Effektoren über das Injektisom in die Wirtszelle wird vermutlich durch die ATP-Hydrolyse der Typ-III-spezifischen ATPase und zusätzlich durch die Protonen-motorische Kraft (PMF) gewährleistet. Die ATPase rekrutiert die Effektoren aus dem Zytosol, dockt diese an den Exportapparat an und fädelt die Effektoren partiell entfaltet in das Injektisom ein. Da für das Flagellum gezeigt wurde, dass die ATPase für den Transport der Substrate nicht essentiell ist [65], geht man davon aus, dass die PMF und die ATPase gemeinsam an der Energetisierung des Translokationsprozesses beteiligt sind [83].

Für den Export besitzen die Effektoren ein Transportsignal in ihrem N-Terminus. Die Natur des Sekretionssignals konnte bis heute nicht eindeutig charakterisiert werden, da für verschieden Effektoren unterschiedliche Sekretionssignale nachgewiesen wurden [29]. In den Arbeiten von Schneewind und Kollegen wurde für den Effektor YopQ ein Sekretionssignal in den ersten 12 Kodons des 5'-UTR Bereichs der wachsenden *yopQ* mRNA nachgewiesen [80]. Dem entgegen konnte gezeigt werden, dass für YopE 15 Aminosäuren und für YopH 17 Aminosäuren am N-Terminus als Signalpeptide für die Translokation dienen [101]. Birtalan *et al.* zeigten, dass durch die Bindung der Chaperone an ihr spezifisches Substrat ein drittes, so genanntes Helfer-signal, für die Sekretion gebildet wird [10, 29]. Für die Effektor-Chaperonpaarungen

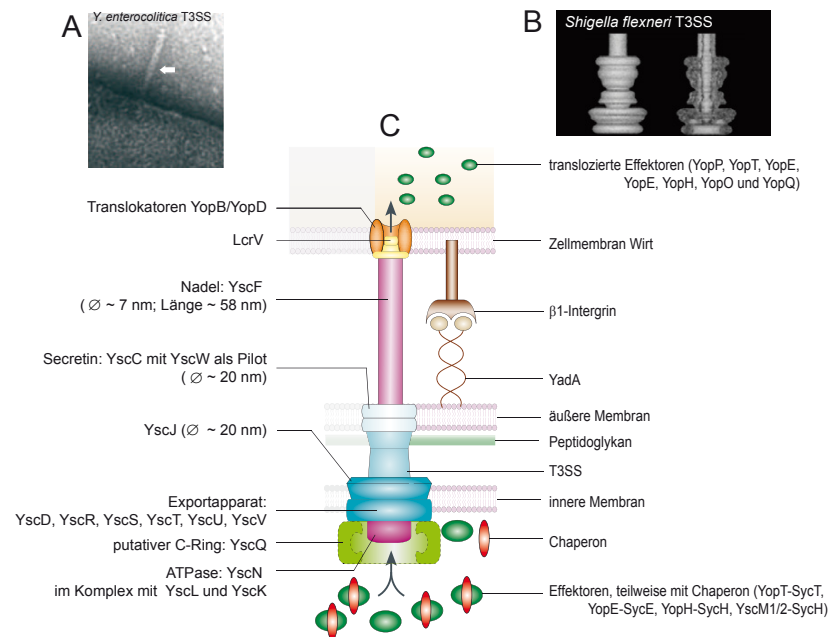


Abbildung 1.4: Die Gestalt des Injektisoms von *Y. enterocolitica* und *S. flexneri*. A: Transmissionselektronenmikroskopie des Stammes *Y. enterocolitica* E40 negativ gefärbt mit 2% Uranylacetat. Der Pfeil weist auf das von der Bakterienoberfläche abstehende Injektisom. B: 3D-Modell der Struktur des Injektisoms von *S. flexneri* basierend auf Kryo-EM aufnahmen [12]. C: Aufbau des aktiven Typ-III-Sekretionssystems von *Y. enterocolitica* modifiziert nach Cornelis *et al.* [25].

YopE-SycE, YopH-SycH und YopT-SycT konnte gezeigt werden, dass das spezifische Chaperon an eine spezielle Chaperonbindedomäne (CBD) bindet, welche sich im N-Terminus direkt hinter dem Sekretionssignals befindet. Dadurch könnte ein zusätzliches dreidimensionales Sekretionssignal aus Effektor und Chaperon entstehen, das dem Effektor während des Translokationsprozesses einen Vorteil gegenüber Effektoren ohne Chaperon verschafft [10].

1.4.2.4 Die Faltungshelfer (Chaperone)

Die Aufgabe einer Anstandsdame (engl.: *Chaperone*) ist die Anerziehung und Überwachung des korrekten Verhaltens ihrer Schützlinge. Bei den molekularen Chaperonen ist das nicht anders. Die Chaperone des T3SS (Syc, *specific Yop chaperone*) schützen die Yops im bakteriellen Zytosol vor Aggregation und Degradation, sie verhindern eine vorzeitige Autoreaktivität der Yops in der Bakterienzelle und halten diese in einem partiell ungefalteten, translokationskompetenten Zustand [10]. Weiterhin tragen sie zur Bildung eines dreidimensionalen Sekretionssignals für die Translokation der Effektoren bei [29]. Die Chaperone werden nicht selbst transloziert, sondern verbleiben im Zytosol. Chaperone des T3SS sind 14-19 kDa groß, haben einen niedrigen isoelektrischen Punkt (pI = 4.4-5.2) und besitzen eine amphiphile α -Helix im C-Terminus. Die Sycs erkennen ihre Substrate im Zytosol, binden diese

und führen sie dem T3SS zu, all das wird ATP-unabhängig betrieben [27, 72, 110]. Für die Effektoren YopE [117], YopH [116], YopO [61] und YopT [50] konnte jeweils ein spezifisches Chaperon nachgewiesen werden. Auf Grund von strukturellen und funktionellen Eigenschaften kann man fünf Chaperon-Klassen formulieren [72, 119]. Ein Chaperon der Klasse I bindet entweder genau einen spezifischen Effektor (IA) oder mehrere Effektoren (IB) des T3SS. Die Klasse II Chaperone binden die beiden Translokatoren, im Fall des *Yersinien*-T3SS YopB und YopD. Sowohl die Gene der Chaperone der Klasse IA, als auch die der Klasse II befinden sich in direkter Nähe zu den Genen ihrer Substrate. Die Chaperone der Klasse III binden die Substrate des flagellären Typ-III-Exportapparates [72]. Die Klasse IV wird alleinig durch das Chaperon Csa gebildet, welches das Filamentprotein EspA des *Escherichia coli* (*E. coli*) T3SS bindet. Klasse V bildet das Chaperon YscE, das zusammen mit YscG die Sekretion des Nadelproteins YscF begleitet [30] und dessen Struktur keine Ähnlichkeiten mit den übrigen Chaperonen aufweist [119]. Für die Klasse I Chaperone SycE [34, 108], SycT [62], SycN [96] und SycH [76] sind hochauflösende Kristallstrukturen bekannt. Obwohl die Aminosäuresequenzen dieser vier Chaperone nur zu 20% identisch sind, ist deren dreidimensionale Struktur fast deckungsgleich: alle sind Dimere und besitzen eine hochkonservierte Faltung aus 5 - 6 β -Faltblättern und 2 - 3 α -Helices [119]. In Abbildung 1.5 (a) wurden die atomaren Strukturen der Chaperone SycE und SycH auf die Struktur von SycT projiziert. Dadurch wird die strukturelle Verwandtschaft der Proteine noch einmal verdeutlicht. Zusätzlich wird in der Abbildung 1.5 (b) anhand der Kristalldaten des SycE-YopE-Komplexes in einem Modell gezeigt, wie die Chaperone ihre zellulären Zielproteine binden können. Im Fall des SycE-YopE Komplexes wird der N-Terminus von YopE komplett entwunden und wie eine Art Gürtel um das dimere Chaperone gelegt. Dabei bleibt die eigentliche Struktur des Chaperons unbeeinflusst [10, 72].

1.5 Die besondere Rolle der Regulatoren

LcrQ/YscM1 und YscM2

Die Expression der *ysc* und *yop* Gene wird durch die Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 37°C aktiviert. Dieser Effekt begründet sich aus dem Zusammenspiel des aktivierten Transkriptionsfaktors VirF und der Temperatur-abhängigen Aufschmelzung von bestimmten Promotorbereichen, was die Bindung von VirF an diese Promotorbereiche ermöglicht. Während es zur vollständigen Expressionsaktivierung der Komponenten des Sekretionsapparates, der Translokatoren und des Proteins YadA kommt, wird im Gegensatz dazu die Expression der Yops und ihrer Chaperone in dieser Phase nur gering angesprochen. Erst durch den Wirtszellkontakt erfolgt die volle Expression und Translokation der Yops [103, 60, 94]. Vermutlich ist der Auslöser die Erkennung eines Konzentrationsabfalls des Ca^{2+} -Spiegels, welcher

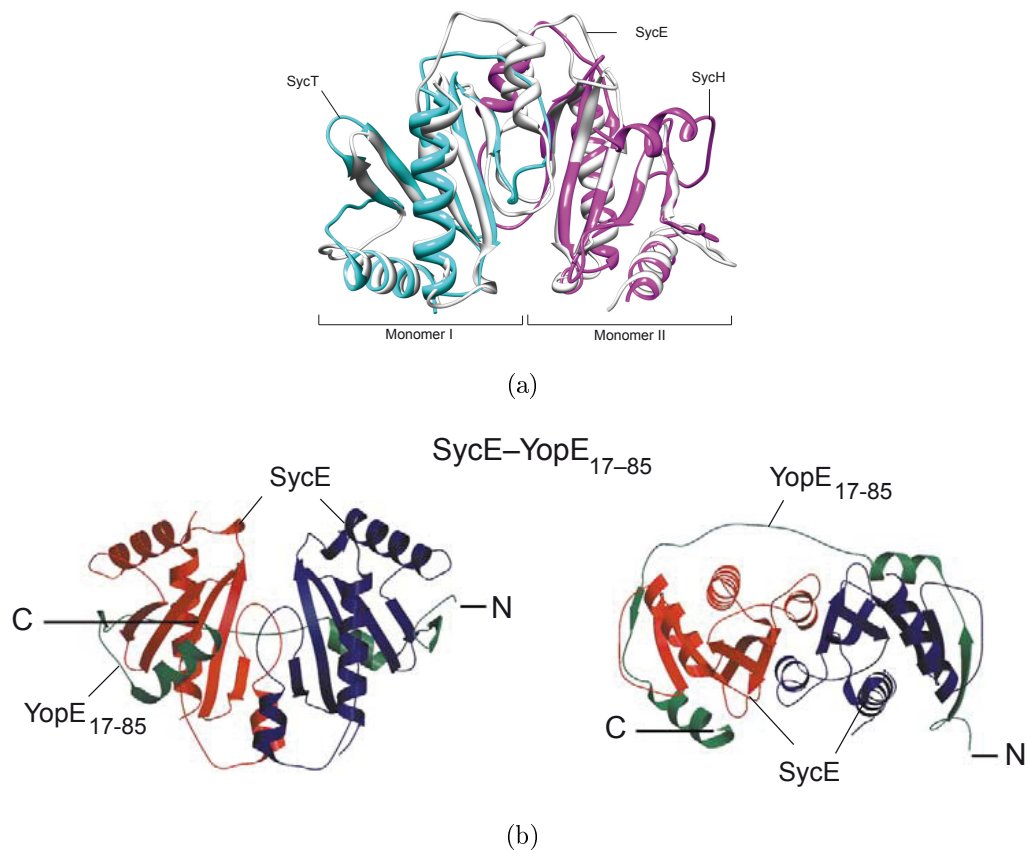


Abbildung 1.5: Die molekulare Struktur der Chaperone SycE, SycT und SycH und des SycE-YopE-Komplexes. (a) Vergleich der Strukturen der Chaperone SycE, SycT und SycH. Obwohl die Chaperone im Allgemeinen eine geringe Sequenzähnlichkeit (ca. 20% Sequenzidentität) zeigen [72], sind die Gemeinsamkeiten in der Faltung deutlich zu erkennen. Für diese Darstellung wurden die atomaren Modelle der Kristallstrukturen von SycT (2BHO, türkis) und SycH (1TTW, magenta) auf das Modell von SycE (1JYA, weiß) mit Hilfe des Programms Chimera projiziert [74]. (b) Modell von SycE im Komplex mit einem Fragment von YopE (Aminosäure 17 bis 85), Vorderansicht (links) und um 90° gekippte Aufsicht (rechts). Deutlich ist das dimere SycE zu erkennen, das den entfaltete N-Terminus von YopE um sich gewickelt hat. [72].

im Wirtszellzytosol im nanomolaren Bereich und in der extrazellulären Matrix im millimolaren Bereich liegt.

Dieses regulatorische Phänomen wird als *low calcium response* (lcr) des Erregers bezeichnet. Es zeigt sich *in vitro* dadurch, dass bei 37°C und Ca^{2+} im Medium keine Yops sezerniert werden. Erst durch die Zugabe eines Ca^{2+} -Chelators werden die Yops in das umgebende Medium sezerniert. Somit besitzt *Y. enterocolitica* einen negativen Rückkopplungsmechanismus, der die vorzeitige Expression und Translokation der Yops kontrolliert.

In der Publikation von Rimpiläinen *et al.* aus dem Jahr 1999 konnte für *Y. pestis* mit LcrQ ein Protein charakterisiert werden, das maßgeblich an diesem Mechanismus beteiligt ist. Die Überproduktion von LcrQ in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*

hat eine Repression der Transkription der *yop* Gene zur Folge. Wird *lcrQ* deletiert, kommt es zu einer unregulierten Überproduktion der Yops und der Sekretion von YopD und LcrV bei 37°C auch in Anwesenheit von Ca^{2+} . LcrQ selbst wird von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* T3-anhängig sekretiert [82, 103]. In *Y. enterocolitica* existiert ebenfalls eine Kopie des *lcrQ* Gens, *yscM1*, das durch eine Duplikation des Gens jedoch zweifach vorhanden ist. Die zweite Kopie wird als *yscM2* bezeichnet [103]. LcrQ und YscM1 sind beide etwa 13 kDa groß und unterscheiden sich nur in einem Aminosäurerest voneinander. Eine Überproduktion des Proteins inhibiert wiederum die *yop*-Expression ohne dabei die eigentliche Sekretion zu beeinflussen [6]. Im Gegensatz zur *lcrQ*-Deletion in *Y. pestis* oder *Y. pseudotuberculosis* zeigt die Deletion des *yscM1* Gens in *Y. enterocolitica* keinen entsprechenden Phänotypen. Erst die Deletion von *yscM1* und *yscM2* zeigt auch in *Y. enterocolitica* den bekannten Phänotypen einer *lcrQ* Mutante in *Y. pseudotuberculosis*. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde für YscM1 und YscM2 eine funktionelle Redundanz postuliert [103]. Beide Gene (*yscM1* und *yscM2*) liegen auf dem pYV-Plasmid von *Y. enterocolitica*. Im Gegensatz zu *yscM1* ist *yscM2* nicht Teil eines Operons. Die Aminosäureidentität von YscM1 und YscM2 liegt bei 57 %, bei einer gemeinsamen Größe von etwa 13 kDa [103]. Trotz des hohen Verwandtschaftsgrades der beiden Proteine liegen die isoelektrischen Punkte (pI) der beiden Proteine erstaunlich weit auseinander. Der pI von YscM1 liegt bei 6,05 und der pI von YscM2 bei 9,79 [103].

Weiter konnte gezeigt werden, dass sowohl YscM1 als auch YscM2 in das Wirtszellzytosol T3-abhängig transportiert werden [20]. Für die zelluläre Funktion von LcrQ/YscM1 und YscM2 wurden zwei unterschiedliche Modelle auf Grund der Wechselwirkung der Proteine mit dem Chaperon SycH postuliert [18, 122]. Beide Modelle gehen von der Beobachtung aus, dass die Funktion von LcrQ/YscM1 bzw. YscM2 in der negativen Regulation der Yop-Expression liegt und dass diese Funktion in direkter Abhängigkeit von der zytosolischen Konzentration der Proteine im Bakterium steht [18, 122]. Cambronne *et al.* gehen davon aus, dass nach der Induktion des T3SS durch Temperaturaktivierung die Proteine LcrQ/YscM1 bzw. YscM2 mit YopD und SycD einen Komplex bilden, der den 5'-untranslatierten (UTR)-Bereich der *yop*-mRNAs bindet. Somit wird posttranskriptionell die Synthese der Yops verhindert. Nach erfolgtem Kontakt zur Wirtszelle und der Bindung von SycH an LcrQ/YscM1 bzw. YscM2 dissoziiert der Komplex und es kommt zur Deblockierung des 5'-UTR Bereiches der *yop*-mRNA, so dass die Translation der *yop*-mRNAs ermöglicht wird. Gleichzeitig werden die Proteine LcrQ, YscM1 und YscM2 SycH-abhängig zum aktiven T3SS transportiert und sekretiert. In der Folge sinkt der zytosolische Spiegel von LcrQ und YscM1/2 ab [18, 19, 20]. Die Abbildung 1.6 stellt dieses Modell grafisch dar.

Diese Hypothese wurde durch die Arbeiten von Wulff-Strobel *et al.* um einen weiteren Aspekt ergänzt [122]. Sie zeigten, dass die negative Funktion von LcrQ in *Y. pseudotuberculosis* im direkten Zusammenhang mit der Interaktion zu SycH

steht. Als Modell diskutieren Wulff-Strobel *et al.*, dass beide Proteine im Komplex miteinander eine Art Torwächterfunktion erfüllen.

Strukturell konnte gezeigt werden, dass die letzten 36 Aminosäuren im C-Terminus von YscM1 und YscM2 essentiell für die negative Regulation der Yop-Synthese sind [20]. Wie bereits erwähnt, basieren beide Modelle zur Funktion von LcrQ, YscM1 und YscM2 auf der Wechselwirkung der Proteine mit ihrem Chaperon SycH. Die hohe Affinität zu SycH erklärt sich aus der hohen Ähnlichkeit der Proteine zum N-Terminus des Effektors YopH, welcher ebenfalls durch SycH gebunden wird [82, 103, 19, 20].

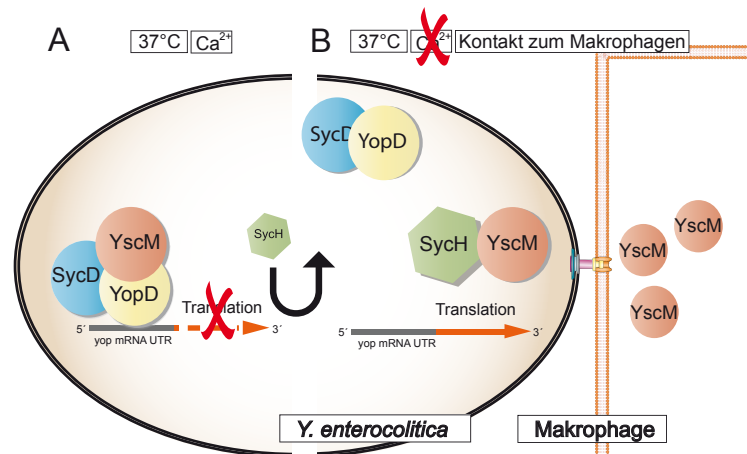


Abbildung 1.6: Modell der Regulation der *yop* Expression durch LcrQ, YscM1 und YscM2 (YscM) nach Cambronne *et al.* [19]. A: Nach Eintritt in den Wirtsorganismus, einer Temperaturerhöhung auf 37°C und in Anwesenheit von Calcium-Ionen bindet ein Komplex aus YopD, SycD, YscM1/YscM2 (YscM) an den 5'-UTR Bereich der *yop* mRNAs. Das führt zur post-transkriptionellen Blockade der *yop* Expression. B: Tritt das T3SS in Kontakt mit der Zellmembran eines Makrophagen, wird ein Signal generiert, das die Dissoziation des Komplexes unter Bindung von YscM an SycH hervorruft. Dadurch werden die 5'-UTR Bereiche der *yop* mRNAs frei und zugänglich für die Translation. YscM1 und YscM2 werden im Zuge der Infektion in die Wirtszelle transloziert, was den zellulären Proteinspiegel von LcrQ, YscM1 und YscM2 absenkt. Die Abbildung wurde modifiziert und vereint Abbildungen aus Cambronne *et al.* (2002) und Cornelis (2006) [19, 25].

Basierend auf den Arbeiten von Stainier *et al.* [103] wurden die Proteine YscM1 und YscM2 als funktionell redundant eingestuft. Dennoch konnten in der Vergangenheit Hinweise für eine differenzielle Funktion des YscM2 jenseits der zellulären Funktion von YscM1 gezeigt werden.

Ein Beispiel dafür ist die Arbeit von Schmid *et al.*, in der zum ersten Mal gezeigt wurde, dass die Funktion von YscM1 und YscM2 nicht auf die Regulation der *yop*-Expression beschränkt ist, sondern dass beide Proteine wichtige Mediatoren zwischen den Vorgängen der Virulenzausprägung und des bakteriellen Stoffwechsels sind [94]. In dieser Arbeit wurde auf Grund der nachweislichen inhibitorischen Wechselwirkung von YscM1 mit dem bakteriellen Stoffwechselenzym Phosphoenol-

pyruvatcarboxylase (PEPC) über einen Mechanismus spekuliert, der den Metabolismus für die Attackierung der Wirtszelle scharf schalten könnte [94]. Im Fall von YscM2 konnte zwar eine Wechselwirkung mit der PEPC nachgewiesen werden, eine inhibitorische Funktion analog zum YscM1 wurde aber nicht gezeigt. Generell zeigt YscM2 im Gegensatz zu YscM1 in der Überexpression keine Wachstumshemmung unter PEPC-abhängigen Minimalbedingungen. Dennoch konnten in der Analyse des Kohlenstoffflusses vergleichbare Effekte beider *yscM1*- und *yscM2*-Mutanten gezeigt werden [94]. Somit könnte YscM2 wie YscM1 ein Mediator zwischen Virulenz und Metabolismus sein.

Ein prägnanter Unterschied zwischen YscM1 und YscM2 ergibt sich aus den Arbeiten von Swietnicki *et al.* [105]. In dieser Arbeit wurde eine Interaktionskarte von zellulären Komponenten (Chaperone, Regulatoren und Effektoren) des T3SS erstellt. Deutlich lässt sich aus den Daten erkennen, dass YscM2 im Vergleich zu YscM1 andersartig in das regulative Netzwerk der Virulenzausprägung von *Y. enterocolitica* eingebunden ist. So wechselwirkt nur YscM2, nicht aber YscM1, mit den Effektor YopQ und dem intrazellulären Regulator TyeA. Des Weiteren binden beide Proteine an SycH, doch die Bindungsaffinität von SycH zu YscM1 ist wesentlich höher als die Bindungsaffinität von SycH zu YscM2 [105].

1.6 Zielstellung

Der Schlüsselprozess für die Virulenzausprägung von *Y. enterocolitica* ist die Expression eines Typ-III-Sekretionssystems und assoziierter Effektoren, die in der Folge die Etablierung der Infektion und die Verbreitung des Erregers im Wirtsorganismus ermöglichen. Dieser Prozess unterliegt einer strikten Kontrolle seitens der Yersinien. Eines der Schlüsselproteine ist der negative Regulator YscM1 von *Y. enterocolitica* (LcrQ in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) [94]. Dieses Protein umfasst gleich drei wichtige Eigenschaften. YscM1 ist ein Repressor der *yop*-Expression [20], es beeinflusst und koordiniert den bakteriellen Stoffwechsel [94] und wird gleichzeitig selbst transloziert, was YscM1 selbst als Effektor prädestiniert [75, 103, 119]. Mit dem *yscM2* Gen konnte speziell in *Y. enterocolitica* eine Duplikation des *yscM1* Gens nachgewiesen werden [103]. Auf Grund der Beobachtung, dass nur eine Doppelmutante beider Gene in *Y. enterocolitica* einen Phänotypen generierte, der einer *lcrQ*-Mutante in *Y. pseudotuberculosis* gleicht, wurde eine Redundanz der beiden YscM Kopien postuliert [103].

Aus den Publikationen von Schmid *et al.* und Swietnicki *et al.* können experimentelle Hinweise entnommen werden, die eine solche Redundanz in Frage stellen. Zum einen ist YscM2 genauso wie YscM1 als Mediator im Stoffwechsel zu verstehen, auch wenn bisher keine Inhibition des Stoffwechselenzyms PEPC durch YscM2 analog zu YscM1 gezeigt werden konnte [94]. Des Weiteren ist YscM2 wesentlich

enger mit dem regulatorischen Netzwerk des T3SS verwoben, da es im Gegensatz zu YscM1 zusätzlich mit dem Regulator TyeA, dem Chaperon SycD und den Effektoren YopH und YopQ interagiert [105]. Zusätzlich lässt sich aus den unterschiedlichen isoelektrischen Punkten von YscM1 ($pI = 6.04$) und YscM2 ($pI = 9.79$) eine andere Funktion für YscM2 postulieren [119].

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte diese Genduplikation näher betrachtet werden. Dazu sollte nach weiteren experimentellen Hinweisen gesucht werden, um die Hypothese einer individuellen Funktion für YscM2 zu überprüfen. Dazu sollte zunächst in einem PCR-Screening die Frage beantwortet werden, ob das Gen für *yscM2* in allen *Y. enterocolitica* Stämmen vertreten ist, oder ob sich *Y. enterocolitica* Stämme finden lassen, die kein Gen für *yscM2* tragen, was im Falle einer vollständigen Redundanz zu erwarten wäre. Weiterhin sollte die Stabilität der Gensequenz betrachtet werden. Dazu sollten mittels Sequenzierung mögliche Polymorphismen der *yscM2* Nukleotidsequenz und deren Auswirkung auf die Aminosäuresequenz ermittelt werden. In der Folge sollte versucht werden, die biologischen Konsequenzen möglicher Variabilitäten aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Antibiotika wurden über die Firmen Amersham, Bio-Rad, Biomol, Invitrogen, Macherey & Nagel, Fermentas, Merck, NEB (*New England Biolabs*) Qiagen, Roche, Roth, Sigma und Santa Cruz bezogen.

2.1.2 Weitere Materialien

Enzyme wurden bei Invitrogen, Merck, NEB, Roche und bei Fermentas gekauft. Verwendete Nährmedien stammen von der Firma Difco und Standard-Antikörper von den Firmen Amersham, Becton Dickinson und Sigma. Die verwendete Nitrocellulose-Membran wurde von Schleicher & Schöll erstanden. Plastikverbrauchsmaterial wurde bei den Firmen Eppendorf, Falcon / Becton Dickinson und Nunc und Roth gekauft.

2.2 Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide

2.2.1 Bakterien

Alle, in der Arbeit verwendeten Patientenisolate wurden durch das Nationale Referenzzentrum für Salmonellen und andere gastrointestinale Erreger (NRZ) des Robert Koch-Instituts, Außenstelle Wernigerode, zur Verfügung gestellt. Die Stammbezeichnung entspricht dem Jahr der Einsendung mit laufender Eingangsnummer. Es wurden nur Patientenisolate in die Analysen einbezogen, die Träger des pYV-Plasmides waren und Yops sezernierten.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme und deren Eigenschaften

Stämme	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (φ 80 <i>lacZ</i> δ M15) <i>hs-</i> <i>dR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	[41]
BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS Cm ^r	Invitrogen, UK
Top10	F'[<i>lacI</i> ^q Tn10(<i>tetR</i>)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-</i> <i>hsdRMS-mcrBC</i>) φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139</i> <i>Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R)</i> <i>endA1</i> λ ⁻	Invitrogen, UK
<i>Yersinia enterocolitica</i> Referenzstämme		
8081	Biotyp 1B, Serotyp 0:8, pYV ⁺	[78]
W22703	Biotyp 2, Serotyp 0:9, pYV ⁺	[26]
WA-314	Biotyp 1B, Serotyp 0:8, pYV ⁺ , Nal ^r	[43]
WA-C	plasmidloses Derivat von WA-314, Nal ^r	[43]
<i>Yersinia enterocolitica</i> Patientenisolat		
07-03351	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-03352	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-03530	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-03531	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-02243	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-02244	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-02561	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-02562	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-03251	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-03588	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-03659	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-03870	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-03908	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-05850	Biotyp 3, Serotyp O:4	
07-06099	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-07347	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-07348	Biotyp 4, Serotyp O:3	
07-08408	Biotyp 3, Serotyp O:5,27	
07-08409	Biotyp 4, Serotyp O:3	
08-01246	Biotyp 4, Serotyp O:3	
08-01311	Biotyp 4, Serotyp O:3	
08-02046	Biotyp 4, Serotyp O:3	
08-02107	Biotyp 3, Serotyp O:9	
08-02610	Biotyp 4, Serotyp O:3	
08-02621	Biotyp 3, Serotyp O:9	
08-02918	Biotyp 4, Serotyp O:3	
08-02952	Biotyp 3, Serotyp O:9	
08-03090	Biotyp 4, Serotyp O:3	
08-03450	Biotyp 4, Serotyp O:3	

08-03692	Biotyp 4, Serotyp O:3
08-03773	Biotyp 4, Serotyp O:3
08-03803	Biotyp 3, Serotyp O:9

2.2.2 Vektoren und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide wurden unabhängig von Trägerstämmen aufgereinigt und getrocknet bei -20 °C gelagert. Für ihre experimentelle Verwendung wurden die Plasmide in die entsprechenden Wirtshintergründe transformiert. Die in der Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide sind der Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Tabelle 2.2: Verwendete Vektoren und Plasmide

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pWS	Expressionsvektor, <i>Ptac</i> -Promotor, <i>lacI</i> ^q -Repressor, Amp ^r	[62]
pACYC184	Klonierungsvektor, moderate copy number, Cm ^r , Tet ^r	NEB, USA
pWSK29	Klonierungsvektor, Cm ^r , Tet ^r	[115]
pETuSycH	Expressionsvektor, exprimiert SycH von <i>Y. enterocolitica</i> WA-314, Km ^r	[71]
pWP3.2	pWS Derivat, exprimiert YscM2 _{BT2-5} mit N-terminalem 6xHis-Tag Amp ^r	diese Arbeit
pWW3.2	pWS Derivat, exprimiert YscM2 _{BT1B} mit N-terminalem 6xHis-Tag, Amp ^r	diese Arbeit
pMBT1B	pMK-T Derivat (Geneart, Deutschland), exprimiert YscM2 _{BT1B} mit C-terminalem RGS-8xHis-Tag unter Kontrolle des Wildtyp-Promotors, Km ^r	diese Arbeit
pMBT2-5	pMK-T Derivat (Geneart, Deutschland), exprimiert YscM2 _{BT2-5} mit C-terminalem RGS-8xHis-Tag unter Kontrolle des Wildtyp-Promotors, Km ^r	diese Arbeit

2.2.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100 pmol/μl von den Firmen Thermo Fisher Scientific, Invitrogen und Biomers bezogen. Jedes dieser Oligonukleotide wurde entsalzt und HPLC- bzw. PAGE-gereinigt. Das Design der Primer wurde mittels Software (Clone Manager) spezifisch zur Zielsequenz mit einer idealen Anlagerungstemperatur von 55 °C gestaltet. Davon abweichende Anlagerungstemperaturen sind jeweils speziell angegeben.

Tabelle 2.3: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'→3'	Restriktionsenzym ¹
Duplex-PCR		
yscM28081intFor	CATGCAAATTGCAGAGTTTGG	
yscM28081intRev	GACGCCCTTGGTAATAGTTTC	
virFFor	TCGGTTTGGTTCTTTGCTTAG	
virFRev	GAATACGTCGCTCGCTTATC	
single Primer PCR des <i>yscM2</i> Genlocus		
yscM2seq2For	GACGTTATGGGGAGCATTATG	
yscM2seq2Rev	TTTGCATGTTCAAGTACCGC	
Sequenzierung des <i>yscM2</i> Genlocus in Patientenisolaten		
M2seqFor04	GAATGCCTGGCTATTGAAGTCG	
M2seqRev02	GCGAACGTAAGCCGGTATAA	
Klonierung His₆YscM2_{BT2-5} und His₆YscM2_{BT1B}		
NdeIBT25HisFor ²	TATACATATGCACCATCACCAT	NdeI
	CACCATGGGGGCATTATGG	
BT25SalIRev	ACTGATCCGTCGACTTAAGTTGTG	SalI
	ATATTAAAGC	
NdeIBT1BHisFor ²	ATATACATATGCACCATCACCAT	NdeI
	CACCATGGGAGC	
BT1BSalIRev	ATCCGTCGACTTAAAGCTTTTGC	SalI
pWSseqFor	GGCTGAAAATCTTCTCTCATCC	
pWSseqRev	GACAATTAATCATCGGCTCG	

¹ Restriktionsschnittstellen sind in der Oligonukleotidsequenz unterstrichen

² Nukleotidsequenz des 6xHis-Tags ist fett markiert

2.3 Nährmedien, Kultivierung und Stammhaltung

2.3.1 Medien

Die Sterilität der Medien wurde durch Autoklavieren bei 121 °C, 1 bar für 20 min gewährleistet. Für die Herstellung von LB-Festmedium wurden 1.5% (w/v) Agar zugesetzt. Temperatur-empfindliche Bestandteile, wie Glukose und Antibiotika, wurden zuvor sterilfiltriert und nur in abgekühltes Medium gegeben. Alle Medien wurde auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt.

2YT-Medium

6.25% Trypton
0.5% Hefeextrakt
0.5% NaCl

Luria-Bertani Medium (LB-Medium)

1% Trypton

0.5% Hefeextrakt

0.5% NaCl

S.O.C.-Medium

2% Trypton

0.5% Hefeextrakt

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glucose

2.3.2 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* und *Yersinia* erfolgte aerob bei 37°C, 27°C und 18°C auf Agarplatten oder im Flüssigmedium in einem Schüttelinkubator (100-200 rpm), um eine ausreichende Belüftung der Kultur sicherzustellen. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über Antibiotika und andere Zusätze, die bei der Kultivierung verwendet wurden. Alle Zusätze wurden vor der Zugabe zur Bakterienkultur steril filtriert.

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Antibiotika und Medienzusätze.

Zusätze	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Antibiotika			
Ampicillin (Amp)	H ₂ O	10 mg/ml	100 µg/ml
Carbenicillin (Car)	50% Ethanol	250 mg/ml	250 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	70% Ethanol	2 mg/ml	20 µg/ml
Kanamycin (Kan)	H ₂ O	5 mg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	70% Ethanol	2 mg/ml	20 µg/ml
sonstige			
CaCl ₂	H ₂ O	1 M	0.2 mM
EGTA	H ₂ O	500 mM	5 mM
Glukose	H ₂ O	20%	0.2%
IPTG	H ₂ O	1 M	variabel
MgCl ₂	H ₂ O	1 M	10 mM

2.3.3 Stammhaltung

Die verwendeten Bakterienstämme wurden auf entsprechenden Agarplatten ohne bzw. mit Antibiotika bei 4°C für maximal 14 Tage gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden die Stämme in 15%(v/v) sterile Glycerol-Lösungen eingebracht und bei -80°C eingelagert.

2.3.4 Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen

Zur Bestimmung der Zelldichte von Bakterien im Flüssigmedium wurde die Suspension im Spectralphotometer (Biophotometer, QIAGEN, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Um Messungenauigkeiten des Gerätes zu vermeiden, wurden die Ansätze ab einer $OD_{595}=1$ entsprechend mit Medium verdünnt. Als Referenzwert diente jeweils das entsprechende Anzuchtmedium ohne Zugabe von Bakterien.

2.4 Molekulargenetische Methoden

2.4.1 Isolierung, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA

2.4.1.1 Zellaufschluss mittels *boiling* Methode

Diese Methode diente dem Schnellaufschluss von Bakterien. Hierfür wurde Zellmaterial direkt von einem LB-Festmedium mittels Impföse abgenommen und in 250 μ l sterilem aqua_{bidest} suspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 99 °C für 10 min im Heizblock (Eppendorf, Hamburg) denaturiert.

2.4.1.2 Präparation von chromosomaler DNA

Für die Präparation von chromosomaler DNA wurden 1.5 ml einer Übernacht-Kultur zentrifugiert, das Zellpellet in 567 μ l TE-Puffer (10 mM EDTA, 10 mM TrisCl, pH 8.0), 30 μ l 10% SDS-Lösung und 3 μ l Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) resuspendiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l einer 5 M NaCl-Lösung und 80 μ l einer CTAB/NaCl-Lösung nacheinander zugegeben und jeweils gründlich gemischt. Es wurde ein äquivalentes Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, gründlich gemischt und für 5 min zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und erneut mit einer äquivalenten Menge an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und die enthaltenen hochmolekularen Nukleinsäuren durch Zugabe von 0.6 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das nach einer weiteren Zentrifugation erhaltene DNA-Pellet wurde getrocknet und in 100 μ l TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei -20 °C.

2.4.1.3 Präparation von plasmidaler DNA

Die Isolation von plasmidaler DNA beruhte auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen und anschließender Anionenaustauscherchromatographie. Bei einer erwünschten Ausbeute von etwa 20 µg Plasmid DNA wurde der *QIAprep Spin Miniprep Kit* QIAGEN, Deutschland verwendet. Sollte eine weit höhere Ausbeute von bis zu 100 µg DNA erreicht werden, wurde das *PureYield™ Plasmid Midiprep System* der Firma Promega GmbH (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Bei der Durchführung der Aufreinigungen wurde strikt nach den Vorgaben der jeweiligen Hersteller gearbeitet.

2.4.1.4 Konzentrierung von DNA

Eine Nukleinsäure-haltige Lösung wurde mit einem 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und dem zweifachen Volumen an absolutem Ethanol versetzt, gevortext und kurz bei 20000 xg zentrifugiert. Es folgte eine Präzipitation der Nukleinsäuren bei -20 °C über Nacht. Anschließend wurde der Ansatz 20 min bei 25000 xg pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen und 10 min bei 25000 xg pelletiert. Der wurde verworfen und das Pellet im *SpeedVac* (Eppendorf, Hamburg) für 15 min bei 30 °C und 20000 xg getrocknet. Das Nukleinsäure-haltige und Ethanol-freie Pellet wurde bei -20 °C dauerhaft gelagert und bei Bedarf durch die Zugabe von sterilem aqua_{bidest} gelöst.

2.4.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von RNA-freien DNA-Präparationen wurde spektrophotometrisch im Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung von Quarzküvetten bestimmt. Dabei entsprach eine OD-Einheit bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml. Durch parallele Messungen bei 280 nm konnten Aussagen über die Qualität der DNA-Präparationen getroffen werden. Ein Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ von 1.8 galt dabei als Kriterium für eine ausreichend Protein-freie Aufarbeitung der Nukleinsäuren. Nur DNA mit einem solchen Qualitätsmerkmal wurde in anschließenden Untersuchungen verwendet.

2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) nach Saiki *et al.* [91]

Die Polymerase Kettenreaktion diente der Vervielfältigung bzw. dem Nachweis von DNA-Bereichen und transformierten Plasmiden. Genomische DNA-Präparationen (Punkt 2.10) wurden in einer 10⁻⁴ Verdünnung eingesetzt. Für die Standardamplifikation nach dem Hot Start Prinzip (QIAGEN, Deutschland) wurden pro 50 µl

PCR-Ansatz: 25 µl Hot Star™ Taq Mix, 15 µl aqua_{bidest}, 2.5 µl je Primer (5 pmol/µl) und 5 µl DNA eingesetzt. Für 10 µl Ansätze wurden 5 µl Hot Star™ Taq Mix, 1 µl je Primer (5 pmol/µl) und 3 µl DNA eingesetzt. Das Verwenden einer Polymerase mit 3'→5'-Korrekturlesefunktion macht es möglich exakte Kopien von DNA-Bereichen zu synthetisieren. Das war speziell für die Sequenzierung und Klonierung von bestimmten Genen unabdingbar. Für diese Anwendung wurden zwei Enzyme mit unterschiedlichen Eigenschaften verwendet. Für die Generierung von *blunt end* Amplifikaten wurde das *AccuPrime™ Pfx Polymerase* Kit (Invitrogen, UK) verwendet und mit Hilfe des *High Fidelity PCR enzyme mix* (Fermentas, Deutschland) konnten Amplifikate mit A-Überhängen synthetisiert werden. Die Verwendung der Polymerasen erfolgte nach den Vorgaben der Hersteller. Die Amplifikation erfolgte im SensoQuest Labcycler (SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland) für 30 bzw. 40 Zyklen.

2.4.3 Einzelprimer-PCR (engl.: *single primer* PCR, spPCR)

Die Einzelprimer-PCR (*single primer* PCR, spPCR) nach Pilhofer *et al.* [77] ist eine spezielle Abwandlung der konventionellen PCR, die es ermöglicht mit Hilfe einer zweiphasigen PCR unbekannte Bereiche, die einen bekannten DNA Bereich umschließen, zu charakterisieren. Dabei bindet ein Primer in der bekannten Zielsequenz bei einer hochspezifischen Anlagerungstemperatur. Nach erfolgter PCR werden so verschieden lange DNA-Einzelstränge erzeugt, die an ihren 5'-Enden bekannte Bereiche tragen. In einem zweiten Schritt bindet derselbe Primer unter nicht-stringenten Temperaturbedingungen unspezifisch an die Einzelstrang-Fragmente. Das führt zur Entstehung von dsDNA-Fragmenten mit unterschiedlichen Längen, welche an ihren 5'- und 3'-Enden die Sequenz des Einzelprimers tragen. In einer anschließenden Amplifikation mit der spezifischen Anlagerungstemperatur des eingesetzten Primers werden die unterschiedlich langen dsDNA-Fragmente amplifiziert. Anschließend erfolgt die Sequenzierung der dsDNA Fragmente mit einem zweiten unabhängigen Primer, der zum ersten Primer eingerückt, aber immer noch im bekannten Teil der Sequenz, bindet.

2.4.4 Enzymatische Modifikation von DNA

2.4.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden spezifische Nukleotidsequenzen (i. d. R. Palindrome) von doppelsträngigen DNA-Molekülen. Dadurch entstehen Fragmente mit definierten Enden. In einem typischen Reaktionsansatz wurden 20 µg DNA der entsprechenden Enzyme eingesetzt. Der Restriktionsverdau wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.4.2 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation von linearisierten DNA-Molekülen zu verhindern wurden die 5'-Enden unter Verwendung des *FastAP[™] Thermosensitive Alkaline Phosphatase* Kit (Fermentas, Deutschland) dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.4.4.3 Ligation linearer DNA-Moleküle

Mithilfe einer T4-DNA-Ligase lassen sich linearisierte Nukleinsäure-Moleküle mit kompatiblen oder glatten Überhängen miteinander verbinden. Die Ligase knüpft eine Phosphodiesterbindung zwischen 5'-phosphorylierten Enden und 3'-OH-Enden unter gleichzeitiger Spaltung von ATP. Dieser Mechanismus wurde benutzt, um Vektor und Insert, in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, zu ligieren. Dabei wurde jeweils 1U der T4-DNA-Ligase (Fermentas, Deutschland) im entsprechenden 1xReaktionspuffer eingesetzt und für 12 bis 16 h bei 16 °C inkubiert.

2.4.5 Sequenzierung von DNA-Molekülen

2.4.5.1 Sequenzierung mittels BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit

Die in der Arbeit angefertigten Sequenzierungen dienten der Bestätigung von Klonierungsendprodukten und dem Beschreiben von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen Genfamilien. Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden etwa 20 ng des DNA Amplifikats für die Sequenzierreaktion eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem automatischen Thermocycler Gene Amp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Deutschland) mit folgendem Programm: 96 °C für 1 min, 25 x (96 °C für 10 s, 50 °C für 5 s, 60 °C für 4 min). Anschließend erfolgte die Analyse der Sequenzierung durch den automatisierten ABI Prism 377 DNA Sequencer des Robert Koch-Institutes. Die Auswertung der Sequenz erfolgte mithilfe des Softwarepaketes *LaserGene 8 SeqMan* (Madison WI, USA).

2.4.5.2 Sequenzierungen mittels GATC, Deutschland

Als Ergänzung zur oben beschriebenen *in house* Sequenzierung wurde der Service der Firma GATC, Deutschland verwendet. Dazu wurden DNA-Moleküle mit einer Konzentration von mindestens 20 µg/µl mit einem Gesamtvolumen von 30 µl zur Sequenzierung eingesandt. Die Auswertung erfolgte analog zum obigen Verfahren.

2.4.6 Elektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

2.4.6.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 1%igen Agarosegelen. Die Auftrennung von zirkulärer DNA erfolgte in 0.7% Agarosegelen. In beiden Fällen wurde 1xTAE (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8.3) als Elektrophoresepuffer verwendet. Die DNA-Moleküle wurden zunächst mit 1xLadepuffer (0.025% Bromphenolblau, 3% Glycerol, 1xTAE) versetzt, in Agarosegelen aufgetrennt (10 V pro cm Trennstecke) und anschließend im Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) gefärbt. Anschließend erfolgte die Detektion der DNA-Banden unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm. Als DNA-Standardmarker diente die *1kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, UK).

2.4.6.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese erfolgte wie im Punkt 2.4.6.1 beschrieben. Allerdings wurde zusätzlich 1 mM Guanosin in das Gel eingegossen und dem Laufpuffer zugefügt, um die DNA vor Quervernetzung und Strangbrüchen durch UV-Licht zu schützen. Das Gel wurde dann nur kurz gefärbt und unter UV-Licht die gewünschten Banden ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit dem *Qiagen Gel Purification Kit* (QIAGEN, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers.

2.4.7 Transformation von DNA

2.4.7.1 Herstellung von elektrokompenten Zellen

Mit einer Übernachtskultur wurden 200 ml LB-Medium 1:50 beimpft. Unter Schütteln wurde die Kultur inkubiert bis sie eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 erreicht hatte. Die Bakterienkultur wurde dann sofort auf Eis gestellt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, weshalb die benötigten Lösungen oder Geräte vorgekühlt wurden. Die Zellen wurden abzentrifugiert (alle Zentrifugationschritte bei 4°C, 4000 xg für 10 min) und zweimal mit 50 ml aqua_{bidest} gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte in 5 ml 10% Glycerol. Das Zellpellet wurde in ca. 900 µl 10% Glycerol resuspendiert und in Aliquots von 40 µl bei -80°C eingefroren.

2.4.7.2 Elektroporation

Zur Transformation von DNA in elektrokompente Zellen wurde die entsprechende DNA mit den Zellen gemischt und in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser II (BIO-RAD, Deutschland)

entsprechend der Betriebsanleitung des Herstellers bei einer Spannung von 2500 V, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 μ F. Danach wurden sofort 900 μ l SOC-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden für 30 min bei 37°C für *E. coli* und 27°C für *Y. enterocolitica* inkubiert und auf Agarplatten unter Selektionsdruck mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

2.4.7.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Für die Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden chemisch kompetente *E. coli* Top10 10 und *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen, UK) verwendet. Hierfür wurde ein Aliquot der Bakterien mit 5 bis 10 μ l Plasmid-DNA versetzt und für 8 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s und eine Inkubation auf Eis für weitere 2 min. Dem folgte die Zugabe von 250 μ l SOC-Medium und eine Inkubation der Transformationskultur bei 37°C für 30 min. Anschließend wurden die Bakterien entsprechend der verwendeten Plasmide auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C selektioniert.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Präparation von sezernierten Proteinen aus dem Kulturüberstand von *Yersinia*

Die Sekretion von *Yersinia* Effektoren in Flüssigkultur wurde durch die Anzucht von *Y. enterocolitica* bei 37°C und Depletion von Ca^{2+} aus dem Medium, durch Zugabe von EGTA, induziert [60]. Hierzu wurde 2YT-Medium + 0.2 mM CaCl_2 mit einer Übernachtskultur von *Y. enterocolitica* beimpft und für 2 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Durch die Zugabe von 5 mM EGTA zum Medium wurde die Yop-Sekretion induziert. Anschließend erfolgte die Sezernierung der Yops in das Medium der *Y. enterocolitica* Kultur durch Inkubation für 2 h bei 37°C und 150 rpm. Für die Präparation der Effektorproteine aus dem Kulturüberstand wurden die Kulturen nach einer Inkubationszeit von 30 min. im Eisbad für 1 h bei 25000 xg und 4°C zentrifugiert. Die sezernierten Proteine im Überstand wurden mit 10% Trichloressigsäure (Endkonzentration im Flüssigmedium) für 1 h bei 4°C gefällt und anschließend 1 h bei 25000 xg und 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend zweimal mit eiskaltem Aceton versetzt, für 10 min bei -20°C gefällt und 15 min bei 25000 xg und 4°C zentrifugiert. Das Proteinsediment wurde bei Raumtemperatur getrocknet und für die Analyse in 30 μ l Laemmli-Puffer gelöst und für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.5.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach Laemmli *et al.* [58] in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Mini Protean 3 Cell, BioRad, München). Die Proteine werden dazu zunächst in Lämmli-Puffer (2.5 ml Tris pH 8.8, 0.5 ml Glycerin, 1 ml Mercaptoethanol, 4 ml 10%iges SDS, Bromphenolblau, ad 10 ml aqua_{bidest}) aufgenommen und 5 min bei 95°C gekocht. Das anionische Detergenz SDS lagert sich an die Proteine an. So entsteht ein negativ geladener Komplex. Die Proteine werden dabei denaturiert. Durch Zugabe von Mercaptoethanol werden außerdem Disulfidbrücken in den Proteinen gespalten. Die große Menge an gebundenem SDS überwiegt die Eigenladung des Proteins deutlich und verleiht ihm eine negative Ladung. Die elektrophoretische Auftrennung der nun stark negativ geladenen Proteine erfolgt so näherungsweise entsprechend der Molekularmasse. Als Größenstandard wurde der *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas, Deutschland) verwendet. Zur Herstellung der Gele wurden die Glasplatten mit 70% Ethanol gereinigt und in den Gießstand eingesetzt. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen (ca. 2 cm unter die Oberkante der kleinen Glasplatte) und mit 2-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisierung der Gelmatrix wurde der Alkohol entfernt, das Sammelgel aufgegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Gele konnten nach etwa 45 min Polymerisierung verwendet werden. Die Rezeptur der Gele ist der Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des verwendeten SDS-PAGE-Systems

Trenngel	Sammelgel
10-16% Acrylamid-Bisacrylamid, Rotipho- re (Carl Roth, Deutschland)	6% Acrylamid-BisAcrylamid, Rotipho- re (Carl Roth, Deutschland)
370 mM Tris pH 8.8	100 mM Tris pH 6.8
0.2% SDS	0.2% SDS
0.2% TEMED	0.2% TEMED
0.04% APS	0.08% APS

Als Laufpuffer diente 1 × SDS-Elektrophoresepuffer (3.02 g Tris, 14.24 g Glycin, 0.1% SDS ad 1 l aqua_{bidest}). Die Auftrennung im Sammelgel erfolgte bei 180 V, 26 mA für 20 min und im Trenngel bei 180 V, 32 mA und 40 min.

2.5.2.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) nach Wilharm *et al.* [120]

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Proteinkomplexen unter nicht-denaturierenden Bedingungen wird als native PAGE bezeichnet. Dabei wird auf die Verwendung von SDS und Mercaptoethanol im Lauf- bzw. Probenpuffer

verzichtet. Des Weiteren wird die Probe nicht gekocht. Das Gelsystem setzt sich wie folgt zusammen:

Nativgel

6% Acrylamid-Bisacrylamid, Rotiphorese (Carl Roth, Deutschland)
25 mM Hepes (pH 7.4)
5 mM NaCl
0.2% TEMED
0.04% APS

Laufpuffer

25 mM Hepes (pH 7.4)
5 mM NaCl
10% Glycerol
0.005% Bromphenolblau

Vor dem Probenauftrag musste das polymerisierte Nativgel bei 100 V für 30 min in Laufpuffer (25 mM Hepes, 5 mM NaCl, pH 7.4) vorlaufen. Die eigentliche Auftrennung fand bei 80 V für 2 h auf Eis statt. Anschließend wurden die Proteinbanden mit Coomassie-Färbelösung detektiert (Ablauf und Rezeptur siehe Punkt 2.5.3.1).

2.5.3 Detektion von Proteinen

Die hier beschriebenen Detektionsarten beruhen auf der Fähigkeit von organischen Farbstoffen sich an die im Gel aufgetrennten Proteine anzulagern. Hauptunterschied zwischen den einzelnen Färbemethoden ist die Sensitivität und die Eigenschaft reversibel zu sein.

2.5.3.1 Proteinfärbung mit *Coomassie Brilliant Blue*

Die Färbemethode mit *Coomassie Brilliant Blue* ist die Standardmethode zur Detektion von Proteinen in Gelen. Diese Färbung ist im Vergleich zu Silber wesentlich weniger sensitiv. Nach erfolgter Auftrennung der Proteine in der PAGE wurde das Gel für mindestens 20 min in Färbelösung (25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 0.05% *Coomassie Brilliant Blue* R250) unter ständiger Bewegung inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Gelbanden für weitere 20 min in Fixierlösung (40% Methanol, 10% Essigsäure) fixiert. Zur Entfärbung des unspezifisch angefärbten Hintergrunds wurde das Gel für mindestens 2 h in aqua_{bidest} entfärbt.

2.5.3.2 Silberfärbung von Proteinen

Die Protein-Silberfärbung wurde nach der Methode von Heukeshoven und Dernick [45] durchgeführt. Das Prinzip dieser sehr sensitiven Färbemethode (5-30 ng Protein/Bande) beruht auf der Reduktion von Silberionen. Dabei werden die Silberionen durch die Seitenketten der Aminosäuren Glutamat, Aspartat und Cystein reduziert. Das entstandene metallische Silber dient in einer nachgeschalteten Entwicklerreaktion als Kristallisationskeim für die Reduktion weiterer Silberionen, so dass an der Stelle, an der sich Proteine im Gel befinden, braune bis schwarze Banden sichtbar werden. Nach der Auftrennung der Proteine in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Gel für 30 min in Fixierlösung (300 ml Ethanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l aqua_{bidest}) und anschließend für 30 min in Inkubationslösung (17 g Na-Acetat in 250 ml aqua_{bidest}, 75 ml Ethanol, 0.5 g Thiosulfat, 1.25 ml Glutaraldehyd (25% w/v)) geschwenkt. Nach 5 Waschschritten á 5 min mit aqua_{bidest} folgte die Inkubation in Silbernitratlösung (0.5 g Silbernitrat, 50 µl Formalin, 250 ml aqua_{bidest}) für mindestens 30 min. Anschließend wurde das Gel so lange in Entwicklerlösung (12.5 g Natriumcarbonat, 50 µl Formalin, ad 5 l aqua_{bidest}) inkubiert bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Gegebenenfalls wurden zusätzlich 10-50 µl Formalin zugegeben. Zum Abbrechen der Reaktion wurde das Gel kurz in Stopplösung (2.5 g Glycerin, 250 ml aqua_{bidest}) inkubiert und anschließend gründlich mit aqua_{bidest} gewaschen.

2.5.4 Immunochemischer Nachweis von Proteinen im Western Blot (Towbin *et al.* [107])

Mit Hilfe des Western Blotting lassen sich elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Gel auf eine Membran immobilisieren, wo diese dann mittels spezifischer Antigen-Antikörperbindung nachgewiesen werden können. Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Schleicher & Schüll) erfolgte mit einem *Semi Dry Blot* Verfahren unter Verwendung der *Trans Blot SD SemiDry Transfer Cell* (BIO-RAD, Deutschland). Hierfür wurden 2 Filterpapiere (GB003, Whatman) in Anodenpuffer I (0.3 M Tris, 20%igem Methanol, ad 1 l aqua_{bidest}), 1 Filterpapier in Anodenpuffer II (25 mM Tris, in 20% Methanol, ad 1 l aqua_{bidest}) und 3 Filterpapiere in Kathodenpuffer (25 mM Tris, 40 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 0.01% SDS ad 1 l aqua_{bidest}) getränkt und in dieser Reihenfolge übereinander auf die Anode gestapelt. Gel und Membran wurden zwischen den in Anodenpuffer II und Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren fixiert. Der Transfer erfolgte bei 22 V, 150 mA für 15 min. Nach dem Transfer wurde die Membran für 2 h in Blockierungslösung [1xTBS (6 g Tris pH 7.5, 8.5 g NaCl), 5% Magermilchpulver] geschwenkt und anschließend für 3 x 5 min mit TBS-Tween20 (6 g Tris pH 7.5, 8.5 g NaCl, 450 µl Tween20, ad 1 l aqua_{bidest}) gewaschen. Danach erfolgte ei-

ne Inkubation über Nacht bei 4°C mit einer optimalen Verdünnung des primären Antikörpers von 1 : 5000 in TBS-Tween20. Nach 5 Waschschritten á 5 min mit TBS-Tween20 wurde die Membran für 1 h mit einer optimalen Verdünnung des sekundären Peroxidase- bzw. Alkalische Phosphatase-konjugierten Antikörpers (Mouse- bzw. Goat Anti-Rabbit IgG, 1:2000 in TBS + 0,6% Magermilchpulver verdünnt) inkubiert. Abschließend wurde die Membran 6 x 5 min mit TBS-Tween20 und mit aqua_{bidest} gewaschen. Die kolorimetrische Detektion von gebundenem Peroxidase-Konjugat erfolgte mittels DAB (Diaminobenzidin) und bei Alkalische Phosphatase-Konjugat mittels BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-indolyl-phosphatase/nitroblue tetrazolium) von Sigma-Aldrich, USA.

2.5.5 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford [14]

Die Quantifizierung von Proteinen nach Bradford beruht auf dem Effekt, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren *Coomassie Brilliant Blue* G250-Lösung von 465 nm auf 595 nm verschiebt, wenn sich der Farbstoff an Proteine anlagert. Dazu wurde der BIO-RAD Protein Assay verwendet. Es wurden 5 µl einer Proteinlösung mit 800 µl aqua_{bidest} versetzt und anschließend mit 200 µl Bradfordreagenz (BIO-RAD, Deutschland) gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. Die Messungen erfolgten im Anschluß gegen Puffer, ohne Protein, als Nullwert und einer BSA-Verdünnungsreihe als Referenz bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.5.6 Einengen von Proteinlösungen

Für das Einengen von Proteinlösungen wurden die Konzentratoren der Firmen Vivascience (Hannover, Deutschland) und Pall (USA) verwendet. Dabei kam Polyethersulfon als Membranmaterial zum Einsatz. Die Ausschlussgröße der Membran betrug ca. $\frac{1}{3}$ des Molekulargewichts des Proteins in Lösung. Im Gegensatz zum Hersteller-Protokoll wurde immer bei max. 5000 g und 4°C eingengt.

2.6 Proteinexpression und Proteinreinigungen

2.6.1 Expression und Reinigung von SycH

Die Produktion von nativem SycH aus *Y. enterocolitica* erfolgte nach den Vorgaben von Neumayer *et al.* [71] unter der Verwendung des pETuSycH Expressionskonstruktes aus selbiger Veröffentlichung. Im Folgenden sollen daher nur die Veränderungen dargelegt werden.

2.6.1.1 Expression im BioFlo®/CelliGen™ 115 Fermenter, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

SycH wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS exprimiert. Eine Übernachtskultur wurde 1:20 in LB-Medium + Amp^r verdünnt. Die Induktion der Expression erfolgte mit 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von ca. 0.4 und die Zellen wurden bei 27°C, 750 rpm, pH 7.5 und maximaler Sauerstoffsättigung im Gesamtvolumen von 1.7 l über Nacht im Fermenter kultiviert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 10000 g geerntet und sofort bei -80 °C eingefroren.

2.6.1.2 Ammoniumsulfat-Fällung

Das Pellet wurde zunächst in Grundpuffer (25 mM Hepes, 1 mM PMSF, pH 8.0) mit 10 mM DTT resuspendiert. Durch die anschließende Zugabe von 10 kU/ml rLysozym und 250 U Benzonase (Merck, Deutschland) wurde das Zellpellet für 30 min bei RT lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 17000 xg geklärt und mit einer gesättigten (NH₄)₂SO₄-Lösung auf 30% (NH₄)₂SO₄ eingestellt. Dies führte zum reversiblen Aussalzen des SycH Proteins. Die Präzipitation der Proteine erfolgte bei 4°C für eine Stunde unter ständiger Rotation. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 17000 xg gewonnen, 3 mal mit Waschpuffer (Grundpuffer, 10 mM DTT und 30% (NH₄)₂SO₄) gewaschen, in Grundpuffer resuspendiert und über Nacht gegen den Grundpuffer mit 100 mM NaCl dialysiert. Bei der Dialyse wurden die Dialysekassetten der Firma Pierce (Thermo Fisher, USA) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet.

2.6.1.3 Ionenaustauschchromatographie

Nach Dialyse wurde das klare Lysat auf eine HiPrep™ Q XL 16/10-Säule (GE Healthcare, Deutschland) gegeben, die vorher mit Grundpuffer und 100 mM NaCl equilibriert worden war. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumen Equilibrierungspuffer (25 mM Hepes, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 8.0) gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem 0-100% Gradienten des Elutionspuffers (Grundpuffer, 1 M NaCl, 1 mM DTT). SycH eluierte bei ungefähr 300 mM NaCl. Die SycH-Fraktionen wurden gepoolt und für die anschließende Gelfiltration aufkonzentriert. Aufgrund der Oligomerisierung von SycH konnten Konzentratoren mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa verwendet werden (Pall, Deutschland). Die Chromatografie-Läufe wurden nach Vorgaben des Herstellers auf einer Äkta Explorer FPLC Chromatographie-Einheit durchgeführt.

2.6.1.4 Gelfiltration

Das Konzentrat wurde auf eine HiLoad Superdex 200 (26/60) (GE Healthcare, Deutschland) geladen, welche mit Äquilibriumspuffer (25 mM Hepes, 100 mM

NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT pH 8.0) äquilibriert wurde. Die Eluat-Fractionen wurden in einer SDS-PAGE analysiert und anschließend wurden die entsprechenden SycH-Fractionen gepoolt bei -80 °C eingelagert.

2.6.2 Expression und Reinigung von YscM2 von *Y. enterocolitica*

2.6.2.1 Klonierung und Überexpression

In einer *proof reading* PCR (Punkt 2.4.2) wurden die Gene für *yscM2* amplifiziert und durch spezielles Primerdesign gleichzeitig 6 Histidinreste an den 5'-Bereich des Genes fusioniert. Als Template dienten die Referenzstämme *Y. enterocolitica* WA-314 bzw. *Y. enterocolitica* W22703. Für die Amplifikation der unterschiedlichen Varianten des *yscM2* Genes wurden die jeweiligen Primer verwendet (Punkt 2.3). Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert (Punkt 2.4.6.2) und anschließend mit den Restriktionsenzymen NdeI und SalI geschnitten (Punkt 2.4.4.1). Der pWS-Vektor wurde ebenfalls mit NdeI und SalI doppelverdaut, dephosphoryliert (Punkt 2.4.4.2) und in einer präparativen Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und extrahiert. Die Fragmente wurden im Anschluss entsprechend dem Punkt 2.4.4.3 über Nacht ligiert. Die Ligationsprodukte wurden am nächsten Tag in *E. coli* Top10 transformiert (Punkt 2.4.7) und auf LB-Platten mit Carbenicillin selektioniert. Am Folgetag wurden 50 Einzelkolonien per PCR auf die Integration des Insert in den pWS-Vektor überprüft und 10 der PCR-positiven Klone wurden mittels Sequenzierung (Punkt 2.4.5.1) geprüft. Korrekte Klone wurden mittels Midipräp aus dem *E. coli* Top10 extrahiert (Punkt 2.4.1.3) und bei -20 °C dauerhaft eingelagert. Die Ligation der YscM2 Inserts ermöglicht die Expression der Gene unter der Kontrolle eines P_{tac} -Promotors. In Abwesenheit des Induktors IPTG ist der Promotor durch den LacI-Repressor blockiert. Zugabe von IPTG induziert die Expression des Fusionsproteins durch Inaktivierung des Repressors. Als Wirtsorganismus für die heterologe Überexpression diente *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, dessen endogene RNA-Polymerase an den P_{tac} -Promotor bindet und die Transkription durchführt. Für die Überexpression wurde das Plasmid frisch in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert. Für die Expression der Fusionsproteine wurden 400 ml LB-Medium mit Carbenicillin 1:50 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0.4 bei 27 °C und 100 rpm im 2 l Schikanekolben angezogen. Die Expression erfolgte durch Induktion mit 0.01 mM IPTG über Nacht bei 18 °C und 100 rpm im Schüttelinkubator. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugieren für 20 min bei 20000 xg geerntet und sofort eingefroren. Als Kontrolle wurden zum Zeitpunkt der Induktion und Zellernte jeweils Proben entnommen, um die Überexpression in SDS-PAGE (Punkt 2.5.2.1) und Western Blot (Punkt 2.5.4) zu verfolgen.

2.6.2.2 Affinitätsreinigung der His₆YscM2 Fusionsproteine

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mittels *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC). Dabei werden zweiwertige Kationen, wie z.B. Ni²⁺ oder Cu²⁺, über einen Chelator (z.B. NTA) an eine stationäre Phase gekoppelt. Diese zweiwertigen Metallionen können wiederum mit den freien Elektronen des Stickstoffes im Imidazolring der Histidine des Fusionsproteins einen Komplex ausbilden und so das Protein auf der stationären Phase immobilisieren. Die Elution erfolgt durch hohe Konzentrationen von Imidazol (das dem Heterozyklus der Histidine entspricht), was das Histidin-fusionsprotein von der Matrix verdrängt. Der IMAC ging ein Zellaufschluss voraus, welcher im Abschnitt 2.6.1.2 beschrieben wurde. Als Grundpuffer diente 25 mM Hepes (pH 7.4) supplementiert mit 1 kU/ml rLysozym, 250 U Benzonase (Merck, Deutschland) und 1 mM PMSF. Das durch Zentrifugation geklärte Lysat wurde anschließend auf 300 mM NaCl und 20 mM Imidazol eingestellt und auf eine zuvor mit Puffer A (25 mM Hepes, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7.4) äquilibrierte HisTrap[™] HP-Säule (GE Healthcare, Deutschland) aufgetragen. Die gebundenen Fusionsproteine wurden mit Puffer A auf der Säule gewaschen und durch einen Gradienten des Puffers B (25 mM Hepes, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7.4) von 0 bis 100% Puffer B eluiert. Die His₆YscM2 Proteine eluierten zwischen 300 mM und 500 mM Imidazol.

2.6.2.3 Ionenaustauschchromatographie der His₆YscM2 Proteine

Durch die Co-Elution von Histidin-haltigen Proteinen aus dem Zelllysate musste ein weiterer Reinigungsschritt eingeführt werden. Dazu wurde das gepoolte Eluat der Affinitätschromatographie dreifach mit 25 mM Hepes, pH 7.4 verdünnt und subtraktiv über eine Anionenaustauschchromatographiesäule (HiTrap[™] SP HP) gereinigt. Durch den hohen pI der His₆YscM2 Proteine wechselwirkten diese nicht mit der Matrix des Anionenaustauschers und waren somit im Durchfluss enthalten. Der Durchfluss wurde anschließend in Konzentratoren mit einer Membran aus regenerierter Cellulose und einer Ausschlußgröße von 3.5 kDa (Pall, Deutschland) auf ein Volumen von 1.5 ml konzentriert. Dem folgte ein Umpuffern des Proteinkonzentrates auf 25 mM Hepes, 100 mM NaCl (pH 7.4) unter der Verwendung von PD10-Säulen (GE Healthcare, Deutschland), um störende Imidazolreste abzutrennen. Die Eluate wurden aliquotiert, auf Trockeneis schockgefroren und dauerhaft bei -80 °C eingelagert. Alle Zwischenschritte der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE (Punkt 2.5.2.1) oder Immunoblot (Punkt 2.5.4) nachvollzogen. Die Gesamtproteinmenge wurde nach Bradford bestimmt (Punkt 2.5.5). Als Chromatografieeinheiten dienten die *Äkta Explorer*- bzw. *Äkta prime*-FPLC (GE Healthcare, Deutschland).

2.7 Gelfiltration zur Bestimmung von Oligomerisierungszuständen von Proteinen

Bei der analytischen Gelfiltration werden apparente Molekulargewichte von Proteinen und Proteingemischen bestimmt. Dabei können die Proteine unter milden Bedingungen ihre bevorzugte Konformation oder Oligomerisierung einnehmen. Der daraus entstehende Komplexe werden entsprechend ihrer Größe durch einen Molekularsiebeffekt aufgehalten, was zu definierten Elutionszeiten führt. Komplexe mit höheren Molekulargewichten passieren die Säule schneller, eluieren also zeitlich eher als kleine Komplexe. Die Gelfiltrationssäule wurde vor jedem Experiment mit einer Mischung aus Proteinen mit bekannten Molekulargewichten kalibriert. Zur Kalibrierung dienten jeweils 50 µg BSA (66 kDa), Carboanhydrase (28 kDa) und Cytochrom C (13 kDa), welche gemeinsam aufgetragen wurden. Die Chromatografie wurde unter Verwendung der Superdex 75 10/300 Global Säule (GE Healthcare, Deutschland) mit einem Puffer aus 25 mM Hepes und 100 mM NaCl (pH 7.4) mit Hilfe einer *Äkta Explorer*-FPLC Einheit (GE Healthcare, Deutschland) durchgeführt. Die benötigten Angaben zur Durchführung wurden den spezifischen Instruktionen des Säulenherstellers entnommen.

2.8 Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie (*engl.: surface plasmon resonance, SPR*)

Bei der Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie werden die Veränderungen des Brechungsindex an speziellen Grenzflächen detektiert, die zum Beispiel durch Bindungsvorgänge an den Grenzflächen selbst hervorgerufen werden können. Dazu wird eine Plasmon-Resonanz an einer dünnen Goldschicht erzeugt, die bis zu 300 nm in das direkt angrenzende Medium eindringt. Werden zum Beispiel Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht, wird ein Interaktionspartner als Ligand auf der Grenzfläche immobilisiert und der zweite Wechselwirkungspartner als Analyt kontinuierlich über den immobilisierten Liganden gespült. Verändert sich der Brechungsindex des angrenzenden Mediums, zum Beispiel durch Ligand-Analyt-Wechselwirkungen, so wird die Plasmon-Resonanz verändert. In dieser Arbeit wurde die Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie verwendet, um das Bindungsverhalten der YscM2 Varianten gegenüber ihrem natürlichem Chaperon SycH zu beschreiben. Alle Messungen wurden mit der BiacoreX100 Apparatur (Biacore, GE Healthcare, Deutschland) bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der BIAevaluation Software 1.1 (Biacore, GE Healthcare, Deutschland). Die Durchführung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers, jedoch modifiziert nach Swietnicki *et al.* [105]. Es wurden CM5-Chips (Biacore, GE Healthcare, Deutschland)

verwendet, die eine kovalente Kopplung der Liganden über Aminogruppen auf einer carboxylgruppenreichen Dextranmatrix ermöglichen.

2.8.1 pH-*scouting*

Zu Beginn jeder Messung werden die besten Immobilisierungsbedingungen für den jeweiligen Liganden bestimmt. Dabei wurde ermittelt, bei welchem pH-Wert und bei welcher Konzentration sich der Ligand auf der nicht aktivierten CM-5 Sensorchip Oberfläche durch ionische Wechselwirkungen optimal aufkonzentrieren lässt. Aus diesem Grund wird der Prozess als *pH-scouting* oder *pre-concentration* bezeichnet. Auf Grund von empirisch-ermittelten Daten¹ wurde der maximale Response-Wert (R_{max}) auf einen Wert von 1000 RU festgelegt und somit musste nur noch der ideale pH-Wert ermittelt werden. Es wurde eine Ligandenkonzentration von 30 ng/ μ l im entsprechenden Acetat- bzw. Hepes-Puffer (siehe unten) für die Injektionen verwendet. Nach initialer Äquilibration des Systems (Flussrate 5 μ l/min) mit Laufpuffer HBS-EP (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,005% P20, pH 7.4) erfolgte das *pH-scouting* nach Vorgaben des Systemherstellers. Die getesteten pH-Bedingungen sind der folgenden Auflistung zu entnehmen.

- 10 mM Na-Acetat pH 5.5
- 10 mM Na-Acetat pH 5.0
- 10 mM Na-Acetat pH 4.5
- 10 mM Na-Acetat pH 4.0
- 10 mM Na-Acetat pH 3.0
- 10 mM Na-Acetat pH 2.0
- 25 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7.4

In den Analysen erwies sich die Verwendung von 10 mM Na-Acetat (pH 5.5) als Puffer für die Immobilisierung der His₆YscM2 Proteine am geeignetsten.

2.8.2 Immobilisierung

Die carboxymethylierte Dextranoberfläche des CM5-Chips wurde zunächst mit Laufpuffer äquilibriert und nach Injektion von NHS/EDC-Lösung (0.05 M NHS, 0.2 M EDC) aktiviert. Zur Immobilisierung des Liganden wurden 10 ng/ μ l der jeweiligen Proteine in 10 mM Na-Acetat pH 5.5 auf den Chip injiziert, bis der gewünschte R_{max} von 1000 RU erreicht wurde. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen, die nicht durch den Liganden gebunden wurden, durch die Zugabe von 1 M Ethanolamin abgesättigt. Der Chip wurde nach erfolgreicher Immobilisierung abschließend zweimal mit Laufpuffer gespült. Alle Bedingungen im Bezug auf Injektionsvolumen und Flussraten wurden dem Biacore-Handbuch und Marquart [64] entnommen.

¹mündliche Kommunikation Dr. Eschricht, RKI

2.8.3 Regenerierung

Um eine kontinuierliche Wiederverwendung des CM5-Chips zu gewährleisten, muss dieser nach jeder Messung vollständig regeneriert werden. Dies bedeutet, dass ein Puffer ermittelt werden muss, welcher in der Lage ist den Analyten vollständig vom Liganden zu verdrängen. Dies wird dadurch ersichtlich, dass die R-Werte der Basislinie vor und nach dem Zyklus identisch sind. Dabei ist eine natürliche Schwankung von ± 2 RU tolerierbar. Die verwendeten Puffer wurden aus den Vorgaben des Herstellerhandbuches und der Publikation Swietnicki *et al.* entnommen [105] und in der folgenden Reihenfolge eingesetzt:

50 mM Glycin/HCl, pH 1.0
50 mM Glycin/HCl, pH 1.5
50 mM Glycin/HCl, pH 2.0
10 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 8.3
10 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 8.8
0.10 mM Glycin/NaOH, 0.3% TritonX100, pH 12.0
3 M MgCl₂
0.1 M NaOH

2.8.4 Kinetische Messungen am BiacoreX100

Die Messungen zur Kinetik der Wechselwirkung zwischen YscM2 und SycH wurden mit Hilfe des integrierten Softwareassistenten und nach den Vorgaben von Swietnicki *et al.* [105] durchgeführt. Die Injektionen des jeweiligen Analyten erfolgte mit ansteigenden Molaritäten ausgehend von 0.1 μ M bis 50 μ M. Die Assoziationszeit des Analyten lag bei 180 s und die Zeit zur Dissoziation des Analyten wurde auf 120 s festgelegt. Jeder Zyklus wurde im Triplet vermessend. Nach Beendigung jeder Messung und jedes Zyklus wurde der Chip mit der Injektion von 10 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 8.3 regeneriert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der System-eigenen Evaluationssoftware *Biacore X100 Evaluation Software 1.1* (Biacore, GE Healthcare, Deutschland).

2.9 Kleinwinkelstreuanalysen

Die Kleinwinkelstreuanalyse (*engl.: small angle X-ray scattering*, SAXS) ermöglicht die Bestimmung der Größe und Gestalt von Einzelmolekülen und Molekülkomplexen in Lösung. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode angewendet, um die Gestalt von YscM2, SycH und des Komplexes aus YscM2 und SycH zu charakterisieren. Dabei wird in einem flachen Winkel monochromatische Röntgenstrahlung in homogene Proteinlösungen eingestrahlt und gestreut. Die gestreuten Intensitäten

unter einem Winkel von 10° werden in einem 2D-Detektor erfasst. Diese kleinen Winkel sind wichtig, denn je größer die Dimension des durchstrahlten Moleküls, desto flacher die Winkel, unter denen die Streuung beobachtet werden kann (Reziprozitätsgesetz). Der Detektor generiert ein spezifisches 1D-Streubild des Moleküls, aus dem dann die wichtigen Parameter zur *ab initio* Berechnung der Molekülgestalt entnommen werden können.

2.9.1 Ermittlung der Streukurven

Zur Ermittlung des Streuverhaltens von YscM2-, SycH- und YscM2-SycH-Lösungen wurden jeweils 100 μg Gesamtmenge mit einer durchschnittlichen Konzentration von 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein in den Einzelmessungen eingesetzt. Für die Detektion der Streudaten des Komplexes von YscM2 und SycH wurde ein molares Verhältnis von einem Teil YscM2 zu zwei Teilen SycH gewählt. Das geforderte Probenvolumen betrug 80 μl . Die Proteine wurden auf Eis aufgetaut und anschließend bei 25000xg zentrifugiert, um etwaige Präzipitate abzutrennen. Die Messungen fanden bei 10°C sowohl in PBS (137 mM NaCl, 12 mM Phosphat, 2.7 mM KCl, pH 7.4) als auch Hepes-Puffer (25 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7.4) statt. Die Synchrotron Röntgenstreudaten wurden nach Vorgaben von Schmidt *et al.* [94] in Kooperation mit Manfred Rössle (EMBL, Hamburg) auf dem Kleinwinkelstreustrahlengang X33 des EMBL Hamburg am Speicherring DORIS III des Deutschen Elektronen Synchrotron (HASYLAB, DESY) in Hamburg aufgenommen. Um Strahlungsschäden der Proben zu vermeiden wurde 8 x für 15 s bestrahlt. Gemessen wurde immer zunächst Puffer, dann Proteinlösung nochmals gefolgt von Puffer. Im Anschluss wurden die Pufferstreubilder von den Proteinstreubildern abgezogen, um die reine Proteinstreuung zu erhalten.

2.9.2 *ab initio* Modellierung von Proteinen

Unter der Verwendung des Atsas 2.3 Datenpaketes² [56] wurden die benötigten Parameter zur *ab initio* Berechnung der Molekülgestalt anhand der ermittelten Streukurven generiert. Die Programme *Primus* und *Gnom* dienten zur Rohdatenprozessierung und Berechnung des Gyrationradius (R_g), der Vorwärtsstreuung $I(0)$ und der Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$. Diese Parameter bildeten die Basis für die eigentliche *ab initio* Modellierung der Strukturen mit Hilfe der Programme *DAMMIN* und *GASBOR* (speziell für kleiner Moleküle wie YscM2). Das Programm *SASREF* wurde speziell zur Modellierung von größeren Molekülkomplexen verwendet. Die so errechneten Modelle wurden mit den Programmen *DAMAVR* und *CHRY SOL* auf ihre Richtigkeit überprüft. Des Weiteren ermöglichten diese Programme die Integration von hochauflösenden Kristalldaten in die zuvor berechneten *ab initio* Modelle.

²www.embl-hamburg.de/biosaxs/software

3. Ergebnisse

Stainier *et al.* postulierten, dass das *yscM2* Gen durch eine Duplikation aus dem *yscM1* Gen entstanden ist. In der selben Arbeit wurde ebenso gemutmaßt, dass YscM2 redundant zu YscM1 sei, da nur die Deletion beider Gene einen Phänotypen generierte, der einer bereits beschriebenen *lcrQ*-Mutante in *Y. pseudotuberculosis* glich [103]. Wenn nach der Verdopplung eines Gens die Entwicklung einer veränderten (*subfunctionalization*) oder neuen Funktion (*neofunctionalization*) ausbleibt, würde man die Anhäufung von Mutationen in einem der beiden Gene erwarten, die letztendlich zum Pseudogen führt [63, 124]. Aus diesem Grund kann eine Untersuchung der Prävalenz zeigen, ob beide Gene stabil weitergegeben werden. Ist das der Fall muss eine Sequenzierung und ein Sequenzvergleich für die Abschätzung der Konserviertheit der beiden Gene herangezogen werden.

3.1 Der Polymorphismus von *yscM2* in klinischen Isolaten von *Y. enterocolitica* und dessen biochemische Charakterisierung

Da bislang keine zusätzlichen Informationen über die Prävalenz des *yscM2* Gens in pathogenen *Y. enterocolitica* vorhanden waren, sollte zunächst mit Hilfe einer PCR das Vorhandensein des Gens in klinischen Isolaten von *Y. enterocolitica* untersucht werden, um zu erfassen, wie verbreitet das *yscM2* Gen in Vertretern der Spezies *Y. enterocolitica* ist.

3.1.1 Prävalenz und Sequenzierung von *yscM2* in *Y. enterocolitica* Patientenisolaten

3.1.1.1 Entwicklung einer Duplex-PCR

Damit eine möglichst große Anzahl von *Y. enterocolitica* Patientenisolaten auf das Vorhandensein eines *yscM2* Gens untersucht werden konnte, wurde auf eine spezielle Variante der PCR-Technik zurückgegriffen. Hierbei wurden in einer einzelnen PCR-Reaktion gleichzeitig zwei unabhängige Amplifikate erzeugt (Duplex-PCR). Dementsprechend wurden zwei Primerpaare für zwei Gene generiert, die bezüglich

Bindungstemperatur, GC-Gehalt und Produktbildungseffizienz in etwa gleich waren. Die Bindestellen der Primerpaare lagen jeweils im kodierenden Bereich des eigentlichen Zielgens *yscM2* und des Kontrollgens *virF*, welches genau wie *yscM2* auf dem Virulenzplasmid (pYV) lokalisiert ist und zum Typ-III-Sekretionssystem gehört. Zur besseren Identifizierung in der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel unterschieden sich die Amplifikate für *yscM2* (200 bp) und *virF* (400 bp) in ihren Größen. Die Sequenzen der Primerpaare wurden mit Hilfe des Programms *Primer3* [88] am Referenzstamm *Y. enterocolitica* 8081 abgeleitet und die besonderen Merkmale der beiden Primerpaare mittels *AutoDimer* [112] verifiziert. Letztendlich wurden die beide Primerpaare *virF*-For/*virF*-Rev und *yscM28081intFor*/*yscM28081intRev* (siehe Tab. 2.3 für Primersequenzen) verwendet. Als optimale Bindungstemperatur wurde 53 °C ermittelt, bei einer Elongationszeit von 1 min. Als DNA Matrize dienten Plasmidpräparationen von *Y. enterocolitica* Isolaten, die zuvor auf das Vorhandensein des pYV-Plasmids und der Fähigkeit Yops zu sezernieren getestet wurden. Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch ein Agarosegel dieser Duplex-PCR, wie sie in den Experimenten Verwendung fand.

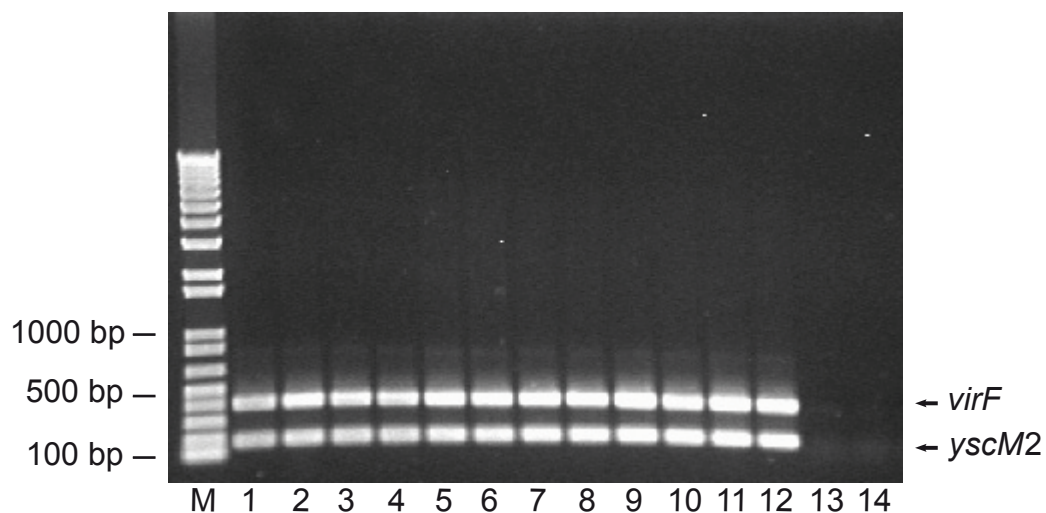


Abbildung 3.1: Duplex-PCR von *Y. enterocolitica* Patientenisolaten. Agarosegelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung nach Punkt 2.4.6.1 zum Nachweis der Amplifikate. Als Negativkontrollen diente ein *Y. enterocolitica* Stamm ohne pYV-Plasmid (WAC) und aqua_{bidest} als Kontrolle der eigentlichen PCR-Komponenten auf Kontaminationen. M: Molekularer Größenstandard, Spur 1-12 *Y. enterocolitica* Patientenisolate, Spur 13 Negativkontrolle I PCR (PCR-Reaktionsansatz mit *Y. enterocolitica* WA-C, trägt kein pYV Plasmid), Spur 14 Negativkontrolle II (PCR-Ansatz mit Wasser anstatt DNA)

Mit Hilfe der Duplex-PCR wurden 140 *Y. enterocolitica* Patientenisolat untersucht. In allen 140 Patientenisolaten waren beide Gene nachweisbar. Schlussfolgernd

lässt sich die Aussage treffen, dass alle *Y. enterocolitica* Stämme, die ein pYV-Plasmid trugen und Yops sezernierten, nicht nur erwartungsgemäß *virF*, sondern auch ein Gen für *yscM2* kodierten. Wenn somit alle getesteten Stämme ein Gen für *yscM2* tragen, wie sieht dann die Sequenz des Gens aus? Kann eine Sequenzierung des *yscM2*-Locus dieser Stämme Unterschiede in den Gensequenzen aufdecken? Anhand unterschiedlicher Gensequenzen könnte man zum Beispiel Hinweise einer differentiellen Entwicklung der *yscM2* Gene ablesen.

3.1.1.2 Sequenzierung des *yscM2* Gens von *Y. enterocolitica*

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Sequenzierung des *yscM2* Gens in verschiedenen *Y. enterocolitica* Patientenisolaten zusammengefasst. Zunächst wurden aus den 140 *yscM2* positiven Stämmen 32 repräsentative Isolate ausgewählt. Die Auswahl der Stämme spiegelte in etwa die Verteilung der Biotypen wieder, wie sie dem Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen und andere gastro-intestinale Erreger im Zeitraum zwischen 2007 und 2008 eingesendet wurden. Die statistische Verteilung der Biotypen wird in Abbildung 3.2 zusammengefasst.

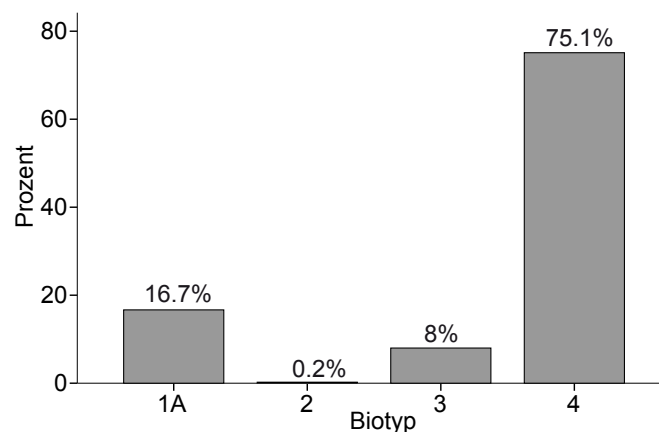


Abbildung 3.2: Verteilung der Biotypen in *Y. enterocolitica* Patientenisolaten im Zeitraum 2007 und 2008. Die angegebenen Werte entsprechen ihrer prozentualen Häufigkeit in einer Gesamtanzahl von 480 erfassten *Y. enterocolitica* Patientenisolaten. Die Berechnung erfolgte mit der Software SPSS PASW Statistics 17.0.

Dabei wird der hohe Anteil der Biotyp 1A *Y. enterocolitica* Stämme deutlich. Diese Stämme wurden von der Studie aber ausgeklammert, da diese kein Virulenzplasmid und somit auch kein *yscM2* Gen tragen. Die genaue Bezeichnung der eingesetzten Stämme ist der Tabelle 2.1 im Kapitel Material und Methoden zu entnehmen. In der Sequenzierung sollten das Strukturgen und mindestens 500 bp vor und nach dem Gen charakterisiert werden. Da zu diesem Zeitpunkt keine Sequenzinformationen zum entsprechenden Virulenzplasmid eines Patientenisolates zur Verfügung standen, wurde mit Hilfe einer *single primer PCR* (spPCR) [77] unter Verwendung der beiden Primer *yscM2seq2For* (Amplifikation des 3'-Bereiches des Gens) und

yscM2seq2Rev (Amplifikation des 5'-Bereiches des Gens) zwei Amplifikate generiert. Somit konnte der mutmaßliche Promotor- und Terminatorbereich des Gens erfasst werden (siehe Abb. 3.3 für Ausrichtung und Lage der Primer). Als Template-DNA dienten Plasmidpräparationen zweier pYV-Plasmide aus Patientenisolaten und das Virulenzplasmid des Referenzstammes *Y. enterocolitica* 8081. Da die Sequenz des Virulenzplasmides des Referenzstammes bereits bekannt war diente dieser als Positivkontrolle in der spPCR. Die Durchführung dieser speziellen PCR ist dem Material und Methodenteil dieser Arbeit unter Punkt 2.4.3 zu entnehmen. Die Sequenzen der Primer sind in der Tabelle 2.3 wiedergegeben.

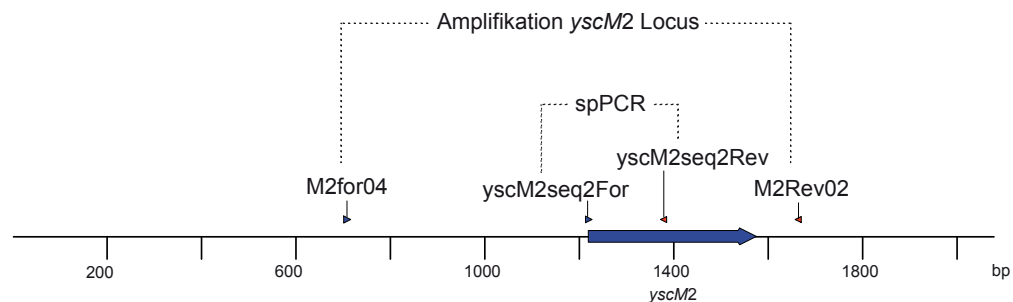


Abbildung 3.3: Ausrichtung und Lage der Primer für die spPCR (yscM2seq2For und yscM2seq2Rev) und die anschließende Amplifikation des *yscM2*-Locus (M2seqFor04 und M2seqRev02)

Ausgehend von den Sequenzen, welche durch die spPCR erhalten wurden die Primer M2seqFor04 und M2seqRev02 (siehe Tab. 2.3 und Abb. 3.3 für Lage der Primer) für die anschließende Amplifizierung der *yscM2* Genloci in den 32 Patientenisolaten abgeleitet. Nach der Amplifikation der Loci wurden die DNA-Fragmente aufgereinigt und in der Sequenzierung eingesetzt. Die Einzelsequenzen wurden anschließend zu Contigs für die entsprechenden Patientenisolatate zusammengefasst. In der Assemblierung der Einzelsequenzen zu Contigs wurden jeweils 90 Nukleotide an den Enden der Einzelsequenzen abgeschnitten. Das verhindert, dass Einzelnukleotidpolymorphismen in das Alignment integriert werden, die alleinig durch methodisch bedingte Fehler in der Sequenzierung selbst entstehen. Anschließend wurde mit Hilfe der CloneManager Software der Leserahmen für das *yscM2* Gen in allen Contigs ermittelt. Des Weiteren wurden zur Vorbearbeitung des Alignments ein Bereich von 190 bp *upstream* des Strukturgens als Promotorregion und 90 bp *downstream* als Terminator festgelegt [42, 87, 104]. Zusätzlich wurde mit Hilfe der Programme BProm¹ und FindTerm¹ die Lage der Promotoren und Terminatoren verifiziert, da sichergestellt werden musste, dass alle regulatorischen Bereiche für die Expression des *yscM2* Gens erfasst wurden und somit Bestandteil des Alignments waren. Anschließend wurden die Sequenzen mit Hilfe des ClustalW-Verfahrens [22] auf ihre Ähnlichkeit zueinander untersucht. Die Abbildung 3.4 stellt dieses Alignment grafisch dar.

¹www.softberry.com

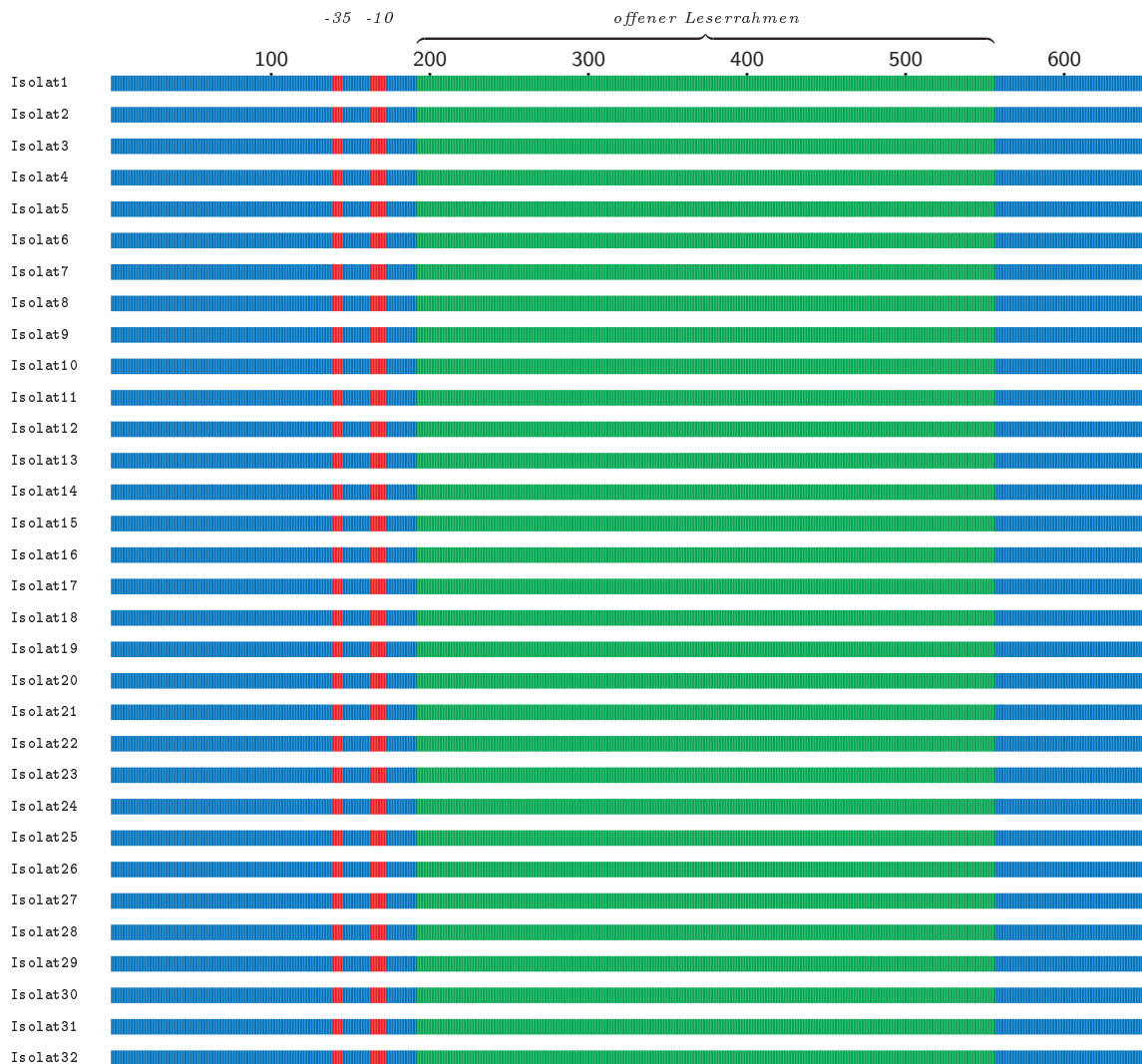


Abbildung 3.4: Alignment aller *yscM2* Einzelsequenzen aus der Sequenzierung von *Y. enterocolitica* Patientenisolaten. Die Einzelsequenzen wurden mit Hilfe des ClustalW-Verfahrens entsprechend ihrer maximalen Sequenzübereinstimmungen angeordnet. Sequenzbereiche, die in allen Nukleotidpositionen des Alignments identisch sind, wurden blau gekennzeichnet. Die -35- und -10 Box sind rot gekennzeichnet. Der offene Leserahmen für das *yscM2* Gen ist grün gekennzeichnet. Die Darstellung des Alignments erfolgte mit TexShade.

Aus der Abbildung 3.4 lässt sich deutlich erkennen, dass alle Sequenzen in dem zuvor definierten Bereich absolut deckungsgleich sind (Abb. 3.4 blau hinterlegter Bereich). Dieser Bereich beinhaltet jeweils den Promotor (rot hinterlegte -35 und -10 Box) und einen offenen Leserahmen (Abb. 3.4 grün hinterlegt), welcher auf Grund seiner Sequenz dem *yscM2* Gen zugeordnet werden kann. Fasst man alle *yscM2*-Sequenzen der klinischen Isolate in einer Gruppe zusammen und vergleicht die homologen Bereiche dieser Sequenzen mit einer Vergleichsgruppe von *Y. enterocolitica* Referenzstämmen aus der NCBI-Datenbank (*Y. enterocolitica* WA-314, *Y. enterocolitica* 8081, *Y. enterocolitica* e127/90 und *Y. enterocolitica* W22703), bilden sich zwei Sequenztypen, bezogen auf den *yscM2* Genlocus, aus. Dabei bilden alle Patientenisolate und der Referenzstamm *Y. enterocolitica* W22703 eine Gruppe, welche der Gruppe der übrigen Referenzstämmen (*Y. enterocolitica* WA-314, *Y. enterocolitica* 8081 und *Y. enterocolitica* e127/90) gegenübersteht. Betrachtet man sich nun die Biotypen der jeweiligen *Y. enterocolitica* Stämme, so fallen alle Biotypen 2 bis 5, zu denen auch der Referenzstamm *Y. enterocolitica* W22703 gehört, in eine Gruppe (im Folgenden als BT₂₋₅ bezeichnet). Im Gegensatz dazu finden sich die Biotyp 1B Stämme, welche hier ausschließlich durch die Referenzstämmen *Y. enterocolitica* WA-314, *Y. enterocolitica* 8081 und *Y. enterocolitica* e127/90 vertreten sind, im zweiten Sequenztyp (BT_{1B}) wieder. Übersetzt man nun die Informationen der Leserahmen in die entsprechenden YscM2 Aminosäuresequenzen und aligniert diese, wird der Polymorphismus erneut sichtbar (siehe Abbildung 3.5).

Somit wirken sich die Nukleotidpolymorphismen auch auf die Proteinsequenzen aus. Deutlich ist in Abbildung 3.5 die Verzweigung bzw. Aufspaltung des Stammbaumes für das YscM2 Protein in die beiden Sequenztypen zu sehen. Um zu zeigen, dass der Sequenzpolymorphismus allein auf YscM2 begrenzt ist, wurden die Sequenzen der YscM1 Proteine aus den bekannten Referenzstämmen analog zu YscM2 mit in die phylogenetischen Analysen einbezogen. In diesem Vergleich wird nicht nur der bereits beschriebene Unterschied zwischen YscM1 und YscM2 bestätigt, sondern auch, dass sich YscM1 nicht wie YscM2, bezogen auf die Biotypen, aufspaltet. Dies zeigt sich eben besonders in dem Fall des Referenzstammes *Y. enterocolitica* W22703. Dieser ist ein Biotyp 2 O:9 Stamm, welcher sich im Fall von YscM1 nicht von den Biotyp 1B Referenzstämmen unterscheidet, aber für das YscM2 Protein mit den klinischen Isolaten eine eigene Gruppe jenseits der anderen Referenzstämmen des Biotyps 1B bildet (siehe Abb. 3.5, rot hinterlegte Stammbezeichnung). Daher bleibt die Entwicklung von YscM2 Sequenztypen unabhängig von YscM1. Welche Auswirkungen der Sequenzpolymorphismus auf die Aminosäuresequenz hat, ist in der Abbildung 3.6 gezeigt.

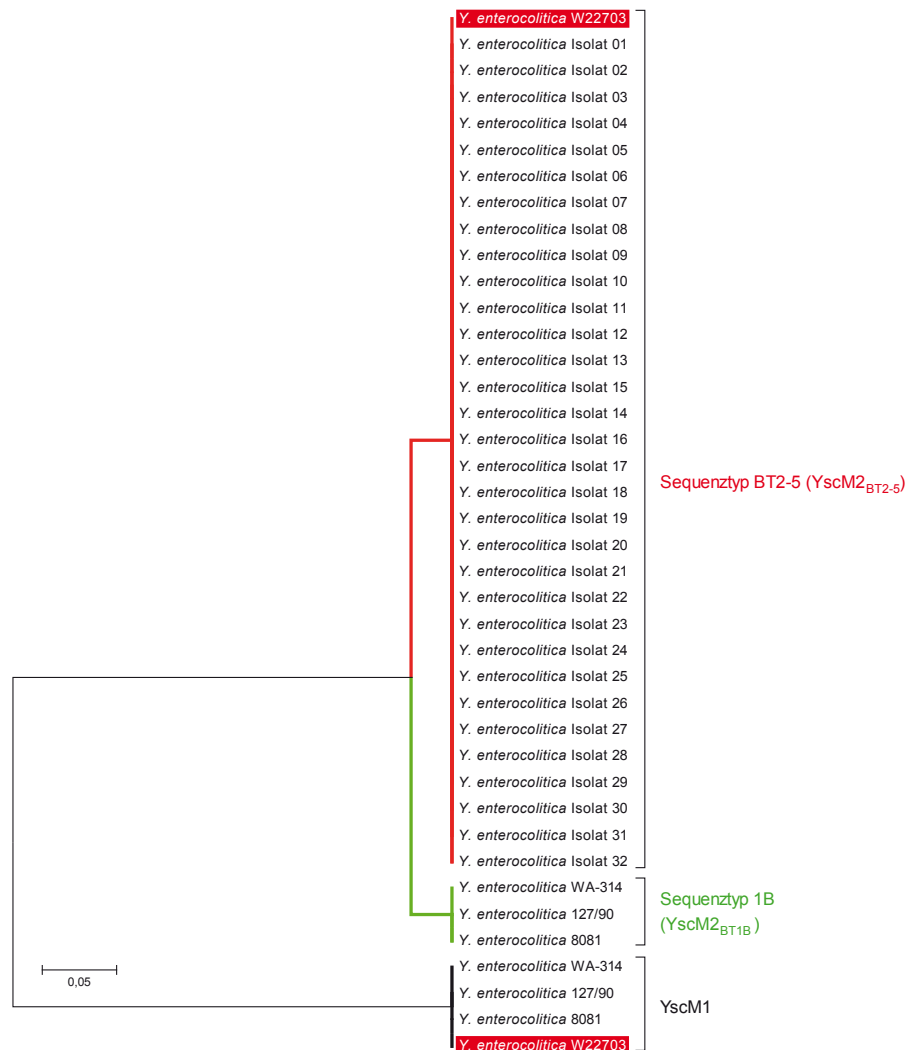


Abbildung 3.5: Phylogenetische Analyse (Bootstrap Neighbor Joining [92]) basierend auf einem Sequenzvergleich verschiedener YscM2 Proteine im Vergleich zu YscM1 aus *Y. enterocolitica*. Die Distanzen im Stammbaum wurden entsprechend ihrer Unterschiede nach der Poisson Korrektur [126] berechnet und geben die Anzahl der Aminosäureaustausche innerhalb der phylogenetischen Linien wieder. Es wurden 112 Aminosäuren in die Berechnungen einbezogen und die phylogenetischen Analysen wurden mit dem Programm *MEGA4* [57] durchgeführt. Im Fall von YscM1 bilden alle Referenzstämme eine phylogenetische Gruppe. Im Gegensatz dazu spalten sich die Aminosäuresequenzen von YscM2 in zwei phylogenetische Linien auf, welche Stämme der Biotypen 2 bis 5 und Stämme des Biotyps 1B gegeneinander abgegrenzten. (Die rot hinterlegte Markierung von *Y. enterocolitica* W22703 ist im Text unter Abschnitt 3.1.1.2 erläutert.

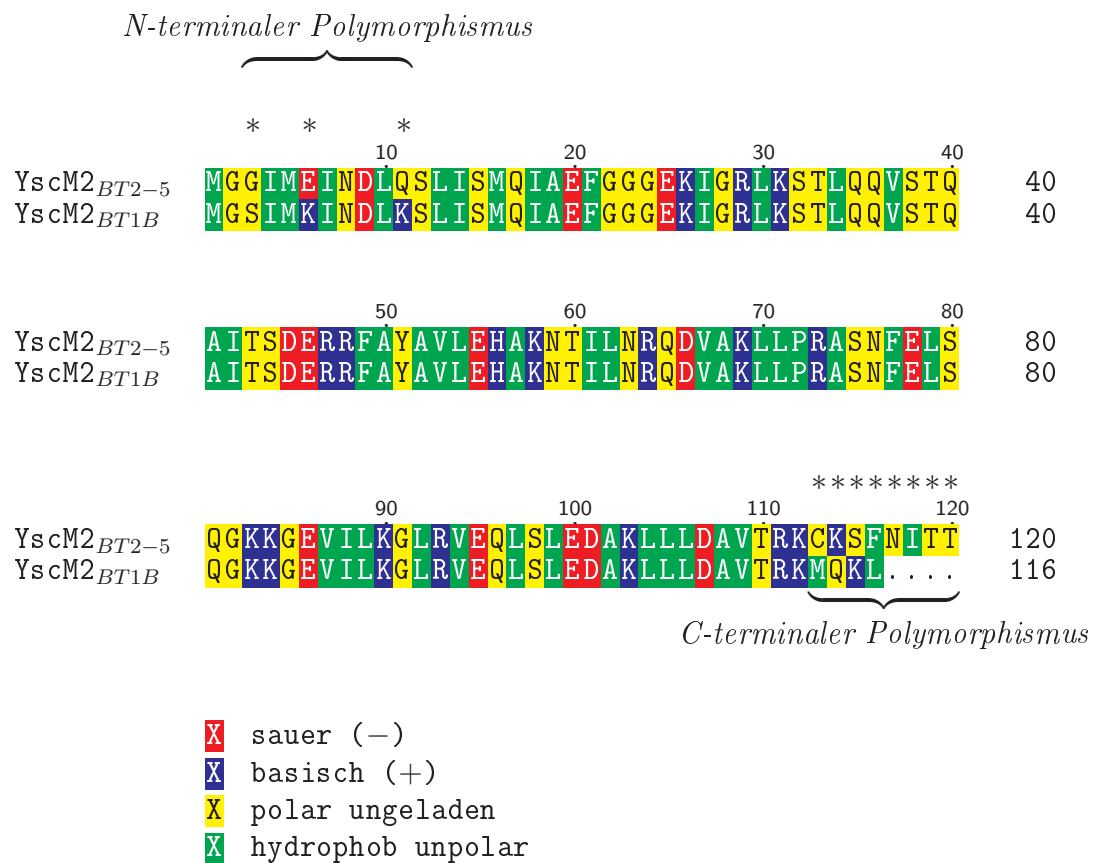


Abbildung 3.6: Polymorphismus der beiden YscM2 Sequenztypen. Vergleich der Aminosäuresequenz der beiden Proteine YscM2_{BT2-5} und YscM2_{BT1B} mit Hilfe von ClustalW [22]. Unterschiede in der Aminosäuresequenz werden an den entsprechenden Positionen durch einen Stern (*) deklariert. Die Einzelpositionen der Aminosäuren sind entsprechend ihrer Hydrophobizität eingefärbt (siehe Legende). Die polymorphen Bereiche am N- und C-Terminus sind durch geschweifte Klammern gekennzeichnet.

Es sind ausschließlich zwei Bereiche am N- und C-Terminus betroffen. Der N-terminale Bereich umfasst drei Austausche an den Aminosäurepositionen drei, sechs und elf. Die Aminosäurenaustausche an den Positionen sechs und elf führen zu Ladungsunterschieden der beiden YscM2 Sequenztypen, da im Fall des YscM2_{BT1B} Proteins zwei basische Aminosäuren wegfallen. Am C-Terminus konnten Austausche für die Positionen 113 bis 116 nachgewiesen werden, zusätzlich besitzt das YscM2_{BT2-5} Protein einen um vier Aminosäuren verlängerten C-Terminus. Eine genauere Aufschlüsselung der Aminosäureaustausche für jede einzelne Position ist der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Gegenüberstellung der Aminosäurepositionen zwischen YscM2_{BT2-5} und YscM2_{BT1B}.

	Austausch der Aminosäure an Position											
	3	6	11	...	113	114	115	116	117	118	119	120
YscM2_{BT2-5}	Gly	Glu	Gln	...	Cys	Lys	Ser	Phe	Asn	Ile	Thr	Thr
YscM2_{BT1B}	Ser	Lys	Lys	...	Met	Gln	Lys	Leu				
	N-Terminus						C-Terminus					

Um weitere Unterschiede zwischen den beiden YscM2 Isoformen zu diskutieren, wurden die Sequenzen mittels ProtParam² [38] hinsichtlich einiger biochemischer Merkmale untersucht. Dabei wurde für die jeweiligen Proteine ein deutlicher Unterschied bezüglich des Molekulargewichts ermittelt [$M_r(\text{YscM2}_{BT2-5})=13.2$ kDa, $M_r(\text{YscM2}_{BT1B})=12.9$ kDa]. Die isoelektrischen Punkte unterschieden sich ebenso deutlich [$pI(\text{YscM2}_{BT2-5})=9.2$, $pI(\text{YscM2}_{BT1B})=9.8$]. Weitere vom Programm ermittelte Parameter, wie etwa Hydrophobizitätsindex oder die Vorhersage der Halbwertszeit, unterschieden sich hingegen nicht wesentlich zwischen den beiden Isoformen.

Zusammenfassend lassen sich drei Kernaussagen aus diesem Abschnitt der Arbeit schlussfolgern: Das *yscM2* Gen ist innerhalb *Y. enterocolitica* ein ubiquitäres Gen, welches sich in Abhängigkeit der Biotypen in zwei Sequenztypen unterteilt. Dabei stehen sich die *Y. enterocolitica* Stämme der so genannten Altwelt-Biotyp 2 bis 5 dem Neuwelt-Biotyp 1B gegenüber. Die Biotyp 1B Stämme werden der Subspezies *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* zugeordnet und sind phylogenetisch klar getrennt von *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica*, in die die Biotypen 2-5 zusammengefasst sind. Des Weiteren ergeben sich keine Hinweise auf eine Pseudogenbildung, da beide Promotoren in ihren Kernbereichen identisch sind und keine frühzeitigen Kettenabbrüche in der Aminosäuresequenz erkennbar sind. Der Nukleotidpolymorphismus setzt sich in den Proteinsequenzen fort, was zu biochemisch unterschiedlichen Isoformen führt (im Folgenden als YscM2_{BT2-5} und YscM2_{BT1B} bezeichnet). Somit drängt sich die Frage nach den biologischen Auswirkungen für den jeweiligen

²<http://expasy.org/tools/protparam.html>

Sequenztyp auf. Um dieser Antwort näher zu kommen, sollten beide Proteine heterolog in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert werden und unter der Verwendung eines N- und C-terminalen 6xHis-Anhangs aufgereinigt werden.

3.1.2 Gewinnung beider YscM2 Proteinisoformen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die genetische Identifizierung der beiden *yscM2* Isoformen beschrieben. Im Folgenden soll nun die Synthese und Aufreinigung der entsprechenden Proteine erläutert werden. Für die Gewinnung der YscM2 Proteine aus den jeweiligen Sequenztypen wurden mittels *proof-reading* PCR die kodierenden Bereiche der *yscM2* Gene amplifiziert. Dabei wurden Oligonukleotide verwendet, die es ermöglichten einen Affinitätsmarker (im Folgenden als *Tag* bezeichnet) in die offenen Leserahmen der YscM2 Proteine einzufügen. Dieser Überhang ermöglichte es, die Zielproteine direkt aus dem Zellaufschluss mittels Affinitätsreinigung (IMAC) aufzureinigen und zusätzlich zu konzentrieren. Sowohl die Theorie als auch der experimentelle Ablauf der verwendeten Methoden ist dem Methodenteil dieser Arbeit unter Punkt 2.6.2 zu entnehmen. Für die Erstellung von Expressionskonstrukten musste zunächst der eigentliche Translationsstart definiert werden, da die Nukleotidsequenz der *yscM2* Gene zwei potentielle Startkodons bereitstellt. In den maßgeblichen Veröffentlichungen bezüglich YscM2 wurden bis dato zwei unterschiedliche Startpositionen für die Klonierung von *yscM2* verwendet. Während die Vorarbeiten von Wilharm und Kollegen mit dem ersten möglichen Startkodon des *yscM2* Gens begannen [120], wurde für die Arbeiten aus der Gruppe um Schneewind und Kollegen ein alternatives Startkodon, 15 Basen strangabwärts verwendet [18].

3.1.2.1 Expression der C-terminalen YscM2-RGSHis Fusionsproteine mit nativem Promotor

Um den genauen Translationsstart zu identifizieren sollten beide YscM2 Isoformen unter der Kontrolle der wildtypischen Promotoren exprimiert werden, um diese anschließend über einen C-terminalen RGSHis₈-Tag aufreinigen zu können. Die Proteine sollten dann in einer Edmann-Sequenzierung oder gekoppelten MS-MS-Analyse hinsichtlich ihrer genauen Aminosäurenkomposition untersucht werden. Gleichzeitig sollten hier bereits die Auswirkungen der N-terminalen Aminosäurevariationen auf Expressionsstärke und Proteinestabilität untersucht werden. Dazu wurden aus je einem Vertreter der Sequenztypen das kodierende Gen für YscM2 mit zusätzlich 200 Nukleotiden strangaufwärts amplifiziert. Diese zusätzlichen Nukleotide sollten den natürlichen Promotor sowie eventuelle zusätzliche regulative Elemente umfassen. Die Festlegung dieser zusätzlichen Nukleotide erfolgte nach den Vorgaben der Publikation von Ross *et al.* [87] und einer Softwarevorhersage mit Hilfe des Programms BProm (www.softberry.com). Die YscM2 Proteine wurden zusätzlich C-terminal mit einem RGS(H₈)-Tag versehen, um die Genprodukte mit Hilfe einer Affinitätsaufreinigung

aufzureinigen. Da das *yscM2* Gen auf dem Virulenzplasmid von *Y. enterocolitica* kodiert ist, das in wenigen Kopien vorliegt [113], sollte durch die Verwendung eines Plasmids mit möglichst geringer Kopienzahl die natürliche Kopienzahl der Gene erhalten bleiben. Dazu wurde der *single copy number* Vector pSC101 [24] verwendet. Dieser Vektor trug zur Kontrolle von Klonierungsschritten einen *lacZ* ORF. Damit ein potentieller *lacZ*-eigener Promotor nicht die Expression des natürlichen *yscM2* Promotors stört, wurde dieser mittels PCR aus dem Vektorrückgrat entfernt. Ausgehend von dem etwa 5.4 kb großen Vektor wurde mit den Primern WSKForBamHI und WSKRevEcoRI ein 4.5 kb großes lineares Fragment amplifiziert, anschließend mit DpnI verdaut und unter der Verwendung einer präparativen Gelelektrophorese aufgereinigt und konzentriert. Gleichzeitig wurde so ebenfalls das lineare Insert, bestehend aus dem *yscM2* Gen mit natürlichem Promotor und Terminator, entsprechend dem Sequenztypen erzeugt. Beide Fragmente wurden mit den Enzymen BamHI und EcoRI verdaut und von den abgespaltenen Überhängen getrennt. Die entstandenen Plasmide trugen die Bezeichnung pSBT25 für den Sequenztyp der BT₂₋₅ bzw. pSBT1B für den Sequenztyp BT_{1B}. In der folgenden Abbildung ist der Syntheseweg der beiden Ligationskomponenten schematisch dargestellt.

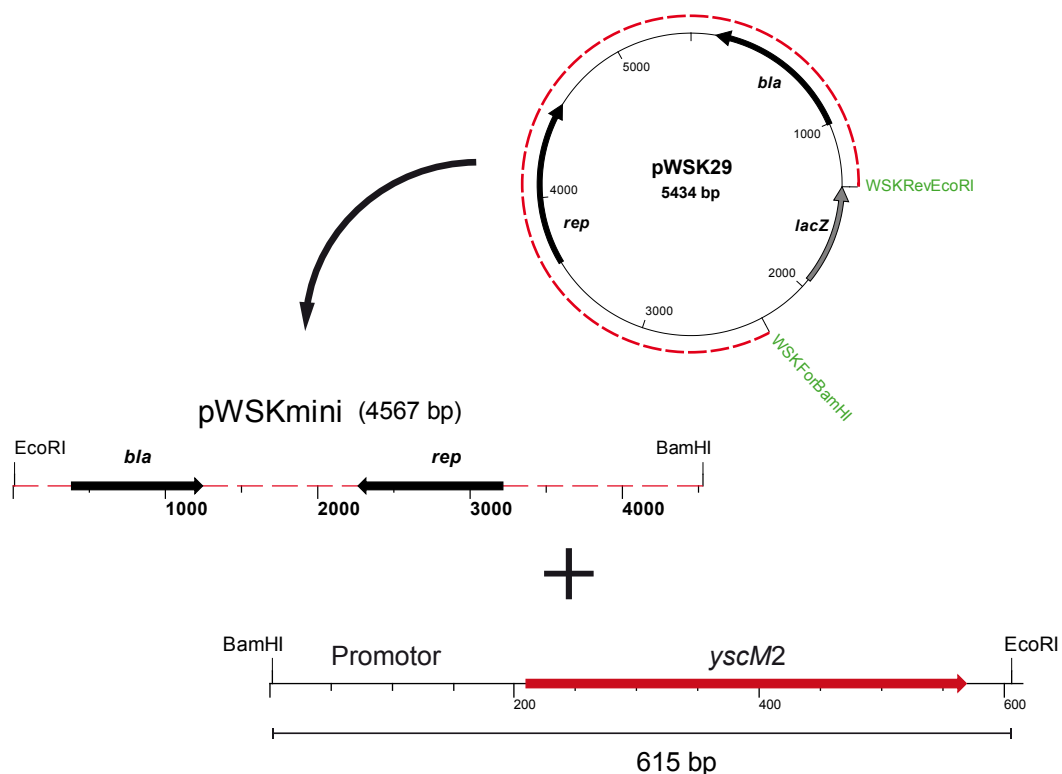


Abbildung 3.7: Klonierungsstrategie zur Expression der YscM2-RGSHis Fusionsproteine unter der Kontrolle des nativen Promotors

In der anschließenden Selektion auf die entsprechenden Plasmide konnten wiederholt nur sehr wenige Plasmid-tragende Kolonien nachgewiesen werden und eine anschließende PCR auf erfolgreiche Ligation erbrachte nur PCR-Produkte, die auf

eine Selbstligation des Ausgangsvektors hindeuteten. Dies wurde durch eine nachfolgende Sequenzierung ebenfalls bestätigt. Es wurden anschließend verschiedene alternative Klonierungsansätze gewählt, um doch noch ein Plasmid zu erhalten, dass eine C-terminale RGSHis-Fusion der jeweiligen YscM2 Proteine unter der Kontrolle der Wildtyp-Promotoren gewährleisten könnte. Dazu wurde, ausgehend von den vorhandenen BamHI und EcoRI Schnittstellen der Inserts, mehrfach der Vektor gewechselt. Anstatt des Vektors pSC101 wurden der *moderate copy number* Vektor pACYC184 (NEB, USA) und die Klonierungsvektoren pMOS (GE Healthcare, Deutschland) und pETblue (Fermentas, Deutschland) eingesetzt. Selbst ein spezielles *high copy number* Vektor System aufbauend auf einem pJet-Vektor (Fermentas, Deutschland) erbrachte keine Plasmide. Des Weiteren wurde als Alternative zur klassischen Ligation ein spezielles Verfahren verwendet, bei dem ein Rekombinasesystems zur Fusion des Vektors und des Inserts über homologe Rekombination verwendet wurde (CloneEZ® PCR Cloning Kit, GenScript, USA). Dazu wurden sowohl an die linearisierten Vektoren, als auch an die Inserts, homologe Sequenzen von 20 Basen fusioniert. Diese homologen Überhänge dienten dann dem Rekombinasesystem zur Bildung von DNA-Duplexen und letztendlich zur Verschmelzung von Vektor und Insert zu einem Plasmid. Auch dieses System erbrachte nicht die gewünschten Plasmide. Zusätzlich wurden alle diese Klonierungsvarianten vor unterschiedlichen Wirtshintergründen, wie der *yscM2* Deletionsmutante, *Y. enterocolitica* WA-C, *Y. enterocolitica* WA-314 und verschiedenen *E. coli* unter Variation der physiologischen Bedingungen (Temperatur, Vollmedien, Mangelmedien) getestet. Keine dieser Variationen erbrachte einen Erfolg. In einem letzten Versuch wurde die Firma Geneart (Deutschland) beauftragt, die Plasmide mittels Gensynthese zu erzeugen. Hierbei werden Fragmente der Inserts durch *de novo* Synthesen erzeugt und in einen Vektor integriert. Ein weiterer Vorteil dieser kommerziellen Synthese liegt in der Hochdurchsatzsuche der entsprechenden Kandidaten. Der Auftrag bestand für jeden Sequenztyp aus zwei Teilprojekten. Zunächst wurde in der *de novo* Synthese das Insert generiert und anschließend in einen speziellen Subklonierungsvektor integriert. Aus diesem Grundvektor sollte dann mittels Restriktion und Ligation das Insert in den *moderate copy number* Vektor pACYC184 umkloniert werden. Letztendlich konnte durch die Firma Geneart das erste Teilprojekt für beide *yscM2* Sequenztypen erfüllt werden. Statt der veranschlagten zwei Wochen Projektdauer benötigte die Firma trotz Hochdurchsatzverfahren sechs Monate zur Generierung der Grundvektoren. Der jeweils zweite Teil der Projekte, die Umklonierung in pACYC184, wurde aber nach wiederholt erfolglosem Versuch von Seiten des kommerziellen Anbieters abgebrochen. Letztendlich wurden zwei Konstrukte bestehend aus Promotor und einem Gen für das jeweilige YscM2 Protein mit einem C-terminalen RGS-His-Tag in einen *high copy number* Vektor kloniert. Die Abbildung 3.8 stellt die beiden Plasmidkarten der jeweiligen Konstrukte mit den daraus resultierenden YscM2-RGS(His)₈ Isoformen dar.

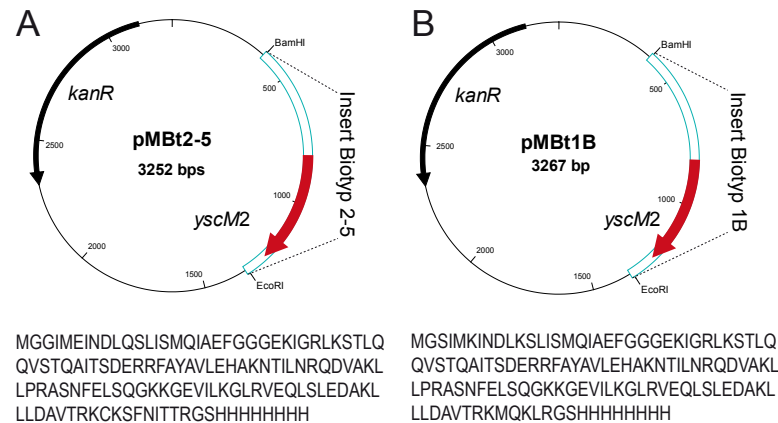


Abbildung 3.8: Klonierungsergebnisse der *de novo* Synthese für beide *yscM2* Sequenztypen durch Geneart, Deutschland. Die erwarteten Genprodukte sind jeweils unterhalb der entsprechenden Plasmide zugeordnet.

Beide Konstrukte wurden auf ihre Fähigkeit zur autonomen Expression der *yscM2* Gene untersucht. Dazu wurden die Plasmide in verschiedene *Y. enterocolitica* Hintergründe (*Y. enterocolitica* WA-314, *Y. enterocolitica* WA-C und *yscM2* Deletionsmutante) transformiert und unter Bedingungen [111], die eine Sezernierung von Yop-Proteinen stimulieren, angezogen. Sowohl die Kulturüberstände, als auch die Zellysate der Bakterien wurden auf das Vorhandensein eines RGS-His getaggen YscM2 Proteins für beide Isoformen untersucht. Dazu wurden der HisSpinTrap Kit (GE Healthcare, Deutschland) verwendet. Bei diesem Verfahren werden die Proteinbestandteile auf einer Nickel-NTA Säule durch Zentrifugation gebunden und aufkonzentriert. Eine Western Blot-Detektion unter der Verwendung eines monoklonalen anti-RGS-His Antikörpers (QIAGEN, Deutschland) sollte die Expression eines Fusionsproteins beweisen. Es konnte jedoch in keiner der Protein-Präparationen ein Signal im Western Blot detektiert werden. Somit konnte die Frage nach dem Startpunkt der beiden YscM2 Proteine in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Da die einzigen Vorarbeiten zur heterologen Aufreinigung des YscM2 Proteins von Wilharm *et al.* [120] stammen und die Autoren das erstmögliche Startkodon verwendeten, soll im Folgenden ebenfalls das erste Startkodon verwendet werden.

3.1.2.2 Heterologe Überexpression der N-terminalen His-YscM2 Fusionsproteine in *E. coli*

3.1.2.2.1 Produktion und Aufreinigung von His₆YscM2_{BT2-5} in *E. coli*

Zur Klonierung des Überexpressionskonstruktes wurde analog zum vorangegangenen Abschnitt der *yscM2* Leserahmen mittels *proof reading* PCR amplifiziert und durch spezielles Primerdesign wurde das 5'-Ende mit Nukleotiden fusioniert, die in der Translation zu einer zusätzlichen Abfolge von sechs Histidinen am N-Terminus des Proteins führen. Die Sequenz der verwendeten Primer (M2Pat200BamHIFor und

M2PatRGSHisStopRIRev) ist der Tabelle 2.3 im Material und Methodenteil zu entnehmen. Für die erfolgreiche Produktion des Proteins wurde das Fusionskonstrukt in einen *high copy number* Expressionsvektor kloniert. Durch die sehr hohe Kopienzahl dieses Vektors können sehr viele Genkopien des gewünschten Konstruktes im *E. coli* Hintergrund generiert werden. Zudem ermöglicht die positionsgenaue Klonierung des Zielgens strangabwärts zu einem P_{Tac} Promotor eine kontrollierbare Überproduktion im entsprechenden *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. In der folgenden Abbildung (Abb. 3.9) ist die Klonierungsstrategie für die Synthese des pWP3.2 (kodiert für YscM2_{BT2-5}) Plasmids erläutert. Das Insert für *yscM2_{BT2-5}* und der Zielvektor wurden mit den Restriktionsenzymen verdaut, im Agarosegel präparativ aufgereinigt und ligiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Integration wurden die Insertionsbereiche mit den Primern pWSseqFor und pWSseqRev sequenziert. Die in der Abbildung 3.9 dargestellte Teilsequenz entspricht dem Gen für His₆YscM2_{BT2-5} resultierend aus einer anschließenden Sequenzierung des Plasmids. Der zusätzlich dargestellte Leserahmen (grüne Beschriftung) bestätigt die gewünschte Aminosäureabfolge der His-getaggten YscM2_{BT2-5} Proteinisoform.

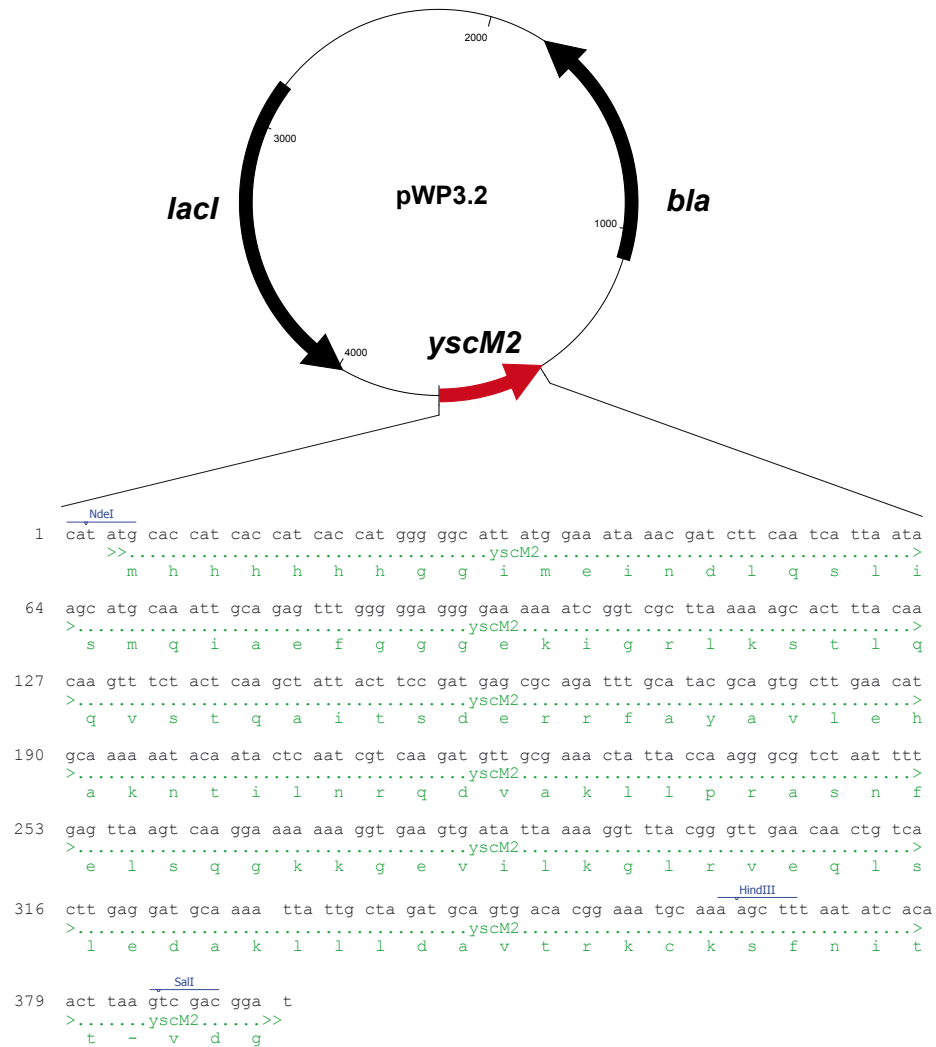


Abbildung 3.9: Expressionskonstrukt zur heterologen Expression der His₆YscM2_{BT2-5} Sequenzvariante in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Dargestellt ist im oberen Bereich das Vektorrückgrat des *high copy number* Vektors pWS ([62]). Darunter ist der sequenzierte Insertionsbereich mit seiner Nukleotidsequenz entsprechend dem *yscM2* Gen dargestellt. Ebenfalls zu entnehmen sind die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme NdeI und SalI. Die HindIII Schnittstelle wurde für den Nachweis der richtigen Ausrichtung des Inserts im Verhältnis zum Vektor verwendet.

In einer Pilotexpression wurde anschließend ermittelt, ob das Konstrukt im *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Stammhintergrund expressionsfähig war. Dazu wurde das Plasmid pWP3.2 in *E. coli* transformiert. Ausgehend von den Einzelkolonien wurde ein Expressionsversuch unter der Verwendung von 0.001 mM IPTG durchgeführt. Der Ablauf dieses Versuchs ist unter dem Punkt 2.6.2 dargestellt. Das Pellet und der Überstand der lysierten Expressionskultur wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Das Zelllysate einer uninduzierten Kultur wurde mit der unlöslichen und löslichen Fraktion einer induzierten Kultur mittels SDS-PAGE analysiert. Die Abbildung 3.10

zeigt, dass mit 0.001 mM IPTG die Expression des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins induzierbar war und dass die löslichen Bestandteile des Überstandes His₆YscM2_{BT2-5} enthielten. Dies lässt sich aus der Abbildung 3.10 im Vergleich der Spur 1 (nicht induziert) mit den Spuren 2 und 3 (induziert) erkennen, da das Auftreten einer deutlich verstärkten Bande mit dem postulierten Molekulargewicht von 13 kDa für His₆YscM2_{BT2-5} ersichtlich ist. Die Löslichkeit der Proteine erschließt sich wiederum aus dem Vergleich der Spuren 2 und 3, da im Vergleich von unlöslichen zu löslichen Bestandteilen nach Zellyse die Bandenintensität in etwa gleich war.

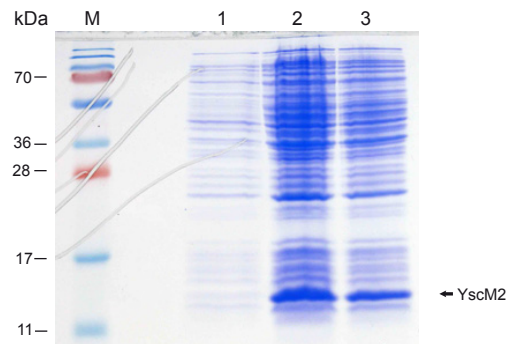


Abbildung 3.10: Pilotexpression der His₆YscM2_{BT2-5} Isoform. Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel gibt eine Übersicht der Pilotexpression des His₆YscM2_{BT2-5} in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS für zwei Einzelkolonien wieder. M: Größenstandard, Spur 1: Zellaufschluss nicht-induziert, Spur 2: unlöslicher Bestandteil nach Zellyse der induzierten Bakterienkultur, Spur 3: löslicher Bestandteil nach Zellyse der induzierten Bakterienkultur

Für die eigentliche Produktion des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins wurden die Vorgaben aus der Pilotexpression weitestgehend übernommen. Um den Ertrag möglichst groß zu gestalten, wurde das Volumen der Hauptkultur auf 1.3 l vergrößert. Im Gegensatz zur Pilotexpression wurde im Zellaufschluss auf die Verwendung von Detergenzien verzichtet. Somit ergab sich ein leicht veränderter experimenteller Ablauf, welcher dem Punkt 2.6.2 zu entnehmen ist. Die Aufreinigung des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins erfolgte an einer ÄktaPrime FPLC-Anlage nach den Angaben des Herstellers für eine solche IMAC-Affinitätsreinigung. Hierbei wurden alle Schritte bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet. Da das His₆YscM2_{BT2-5} jedoch über keine Tryptophane verfügt, konnte es bei 280 nm nicht detektiert werden. So kann an dieser Stelle allein auf eine SDS-PAGE verwiesen werden, um den Verlauf der Reinigung darzustellen. Die Abbildung 3.11 gibt einen Überblick über die IMAC-Affinitätsreinigung des His₆YscM2_{BT2-5} Fusionsproteins.

Aus der Analyse der ersten drei Spuren in Abbildung 3.11 ergibt sich, dass eine Zellyse stattgefunden hat. Vergleicht man dazu die Überstände (Spur 3) und den Durchlauf (Spur 4) in derselben Abbildung 3.11, so erkennt man das Verschwinden von Proteinbanden, was für eine Anreicherung von Histidin-haltigen Proteinen auf

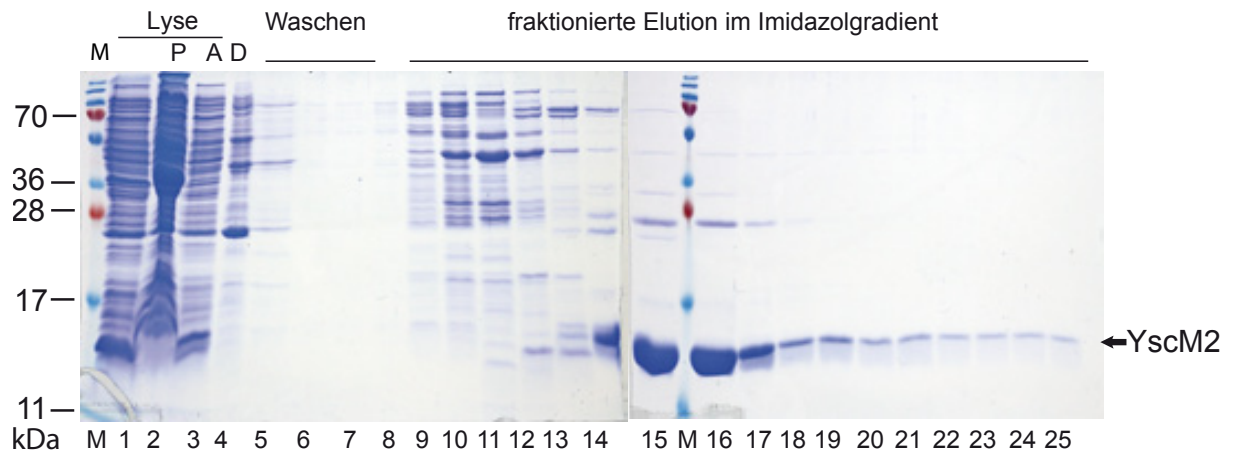


Abbildung 3.11: Affinitätsreinigung der His₆YscM2_{BT2-5} Isoform. Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel gibt eine Übersicht über die Reinigung von His₆YscM2_{BT2-5} in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Spur 1: Gesamtzelllysat zum Zeitpunkt der Zellernte; Spur 2: Pellet der Zelllyse (P); Spur 3: Überstand der Zelllyse und gleichzeitig Säulenauftrag zur IMAC-Affinitätsreinigung von His₆YscM2_{BT2-5} (A); Spur 4 bis 7: nichtgebundenes Material (D) und Waschfraktionen mit Äquilibrationpuffer (25 mM Hepes, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7.4); Spur 8 bis 25: Fraktionen im Imidazolgradient von 20 mM bis 500 mM Imidazol im Grundpuffer (25 mM Hepes, 300 mM NaCl, pH 7.4)

der IMAC-Säule steht. An dieser Stelle soll bereits auf die Abbildung 3.13 verwiesen werden. Diese Abbildung fasst nochmals die Aufreinigung von His₆YscM2_{BT2-5} zusammen. Betrachtet man dort in den Teilabbildungen a und b die Spuren 1 und 2 stellen sich dieser Vergleich unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinkonzentrationen nochmals im SDS-PAGE und Western Blot dar. Aus dem Bandenmuster der Spur 3 ist zu erkennen, dass eine Bande bei 13 kDa angereichert wurde. Dies ist durch die Wechselwirkung der N-terminal fusionierten Histidine im His₆YscM2_{BT2-5} Protein zu erklären. Somit konnte das YscM2_{BT2-5} Protein auf der HisTrap HP Säule immobilisiert werden. Da die Interaktion zwischen Histidinen und der Ni-NTA-Matrix recht unspezifisch ist, wurde in einem Waschschritt unspezifisch gebundenes Material mit Äquilibrationpuffer (25 mM Hepes, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7.4) abgewaschen. Das His₆YscM2_{BT2-5} Protein selbst eluierte bemerkenswert spät in einem Bereich zwischen 400 und 500 mM Endkonzentration Imidazol im Grundpuffer. Im Vergleich dazu eluieren die Mehrzahl der His-getaggten Proteine laut Hersteller (GE Healthcare, Deutschland) bei Imidazolkonzentrationen von 250 - 300 mM. Die Elution zeigt sich sehr deutlich in der Zunahme der Bandenintensität bei etwa 13 kDa in den Spuren 14 bis 16 der Abbildung 3.11. Dies weist auf eine sehr effektive Aufkonzentrierung des Fusionsproteins hin. Des Weiteren kann man bei der Betrachtung der Spuren 14 bis 17 in der Abbildung 3.11 zusätzliche Banden erkennen, die auf Kontaminationen in der Aufreinigung hinweisen. Dies erforderte einen weiteren Aufreinigungsschritt für das Fusionsprotein His₆YscM2_{BT2-5}. Dabei wurde

der hohe isoelektrische Punkt von über 9 der YscM2 Isoformen ausgenutzt. Somit bleibt die Nettoladung des Proteins in einer pH-neutralen Lösung stark positiv. Ein solches positives Molekül kann mit der Matrix eines Anionenaustauscher demnach nicht wechselwirken und würde aus einem Proteingemisch als Durchfluss subtraktiv abgereinigt werden. Angewandt auf His₆YscM2_{BT2-5} wurden die Fraktionen in den Spuren 15, 16 und 17 (Abb. 3.11) gepoolt, die Konzentration von NaCl im Medium durch Verdünnung der Eluate mit 25 mM Hepes (pH 7.4) auf 100 mM eingestellt und auf einen starken Anionentauscher mittels FPLC gegeben. Der gesamte Durchlauf wurde gesammelt und die gebundenen Kontaminationen mit Elutionspuffer (25 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.4) von der Matrix eluiert. Die Abbildung 3.12 fasst diese subtraktive Anionenaustauscherchromatografie (IEX) nochmals zusammen. In Spur 1 ist der stark verdünnte Säulenauftrag (siehe Abb. 3.12 A) zu sehen und in den Spuren 1 bis 20 die kontinuierliche Abreicherung des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins. In den Spuren 21 und 22 derselben Abbildung ist die Elution der gebundenen und somit aufkonzentrierten Kontaminationen dargestellt.

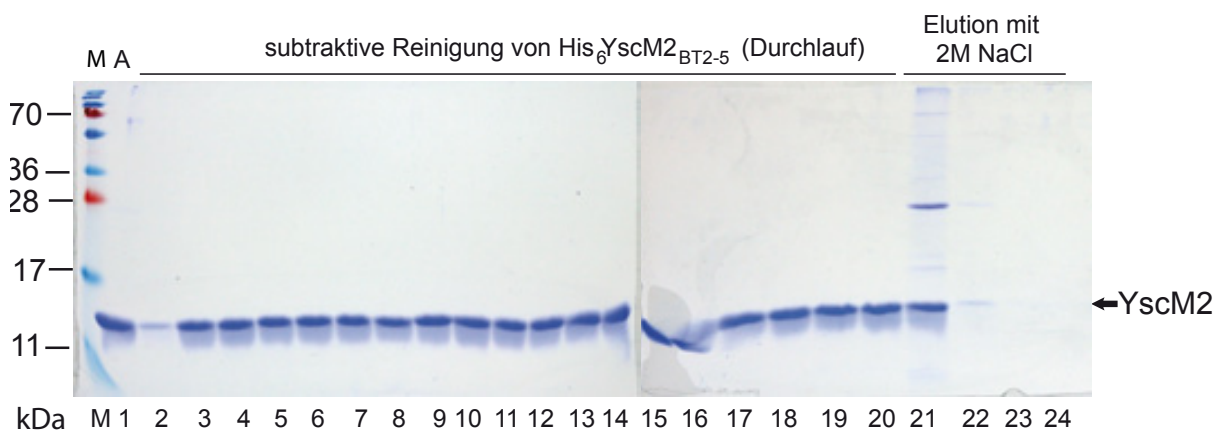


Abbildung 3.12: Subtraktive Abreicherung von His₆YscM2_{BT2-5} mittels Anionenaustauscherchromatografie (IEX). (a) Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel der subtraktiven Abtrennung der His₆YscM2_{BT2-5} Isoform von Kontaminationen aus der Expression in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Spur 1: Säulenauftrag; Spur 2 bis 20: Fraktionen des nicht gebundenen His₆YscM2_{BT2-5}; Spur 21 bis 24: Fraktionen der gebundenen Kontaminationen eluiert mit 25 mM Hepes, 1 M NaCl (pH 7.4)

Dieser Nachreinigung folgte eine Aufkonzentrierung der Proteinlösung und ein Umpuffern auf den Grundpuffer (25 mM Hepes, pH 7.4), um störende Salzionen und restliches Imidazol zu entfernen. Um die Aufreinigung des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins abschließend zu bewerten ist in der folgenden Abbildung 3.13 die Aufreinigung des Zielproteins nochmals in Form von SDS-PAGE und Western Blot zusammengefasst. Als Proben wurden wichtige Ausgangs- und Zwischentappen der Aufreinigung ausgewählt und unter Berücksichtigung der verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Wie zuvor bemerkt erschließt sich aus den Spuren 1 und 2 der Abbildung

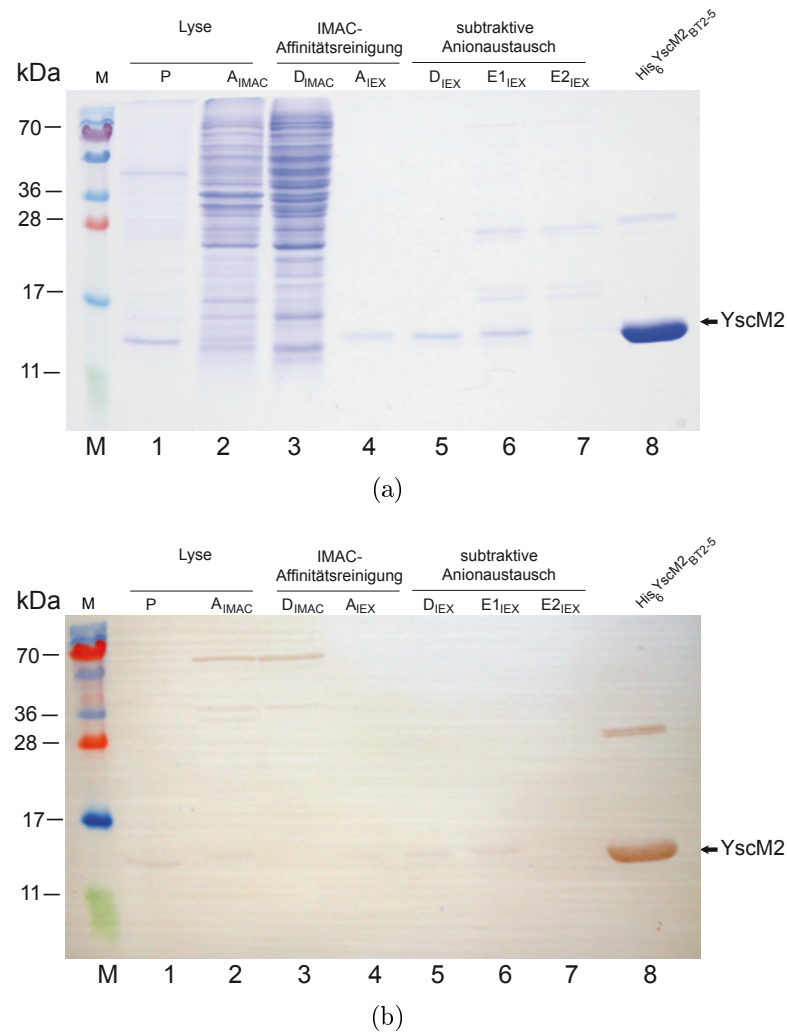


Abbildung 3.13: Zusammenfassung der Expression und Reinigung von His₆YscM2_{BT2-5}. (a) Coomassie gefärbtes SDS-Gel, (b) Entsprechender Western-Blot mit einem anti-YscM2 Antiserum aus dem Kaninchen (1:5000). Spur 1 und 2: Zusammenfassung der Lyse, unlöslicher Bestandteil des Gesamtlisates (Spur 1, P) und löslicher Bestandteil der Lyse und somit Säulenauftrag der IMAC-Aufreinigung (Spur 2, A_{IMAC}); Spur 3 ungebundenes Material in der Affinitätsreinigung (D_{IMAC}); Spur 4: His₆YscM2_{BT2-5} Eluat der Affinitätsreinigung (Spur 4, A_{IEX}); Spur 5: Säulendurchlauf der subtraktiven Anionenaustauscherchromatografie (Spur 5, D_{IEX}); Spur 6 und 7 Fraktionen der gebundenen IMAC-Kontaminationen nach Elution mit 25 mM Hepes, 1 M NaCl (pH7.4)(E1_{IEX} und E2_{IEX}); Spur 8: Konzentrat des His₆YscM2_{BT2-5} Fusionsproteins nach erfolgter Expression und Aufreinigung

3.13a, dass das exprimierte His₆YscM2_{BT2-5} Protein nach der Lyse teilweise löslich war. Das Fusionsprotein His₆YscM2_{BT2-5} konnte im Zuge einer Affinitätsaufreinigung aufkonzentriert und aufgereinigt werden (Abb 3.13a/b, jeweils Spur 4). Die subtraktive Abreinigung des Proteins von verbleibenden Kontaminationen aus der IMAC-Aufreinigung (Abb.3.13a/b, Spur 5 bis 7) mit einer abschließenden Konzentrierung (Abb.3.13a/b, Spur 8) erbrachte ein fast reines His₆YscM2_{BT2-5} Protein.

Der Grad der Reinheit erreichte mehr als 90%. Verdeutlicht wird das durch die Spur 8 in der Abbildung 3.13a. Des Weiteren bestätigt ein Western Blot unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums gegen YscM2 die Aufreinigung des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins durch ein deutliche Signal bei einer Größe von etwa 13 kDa (Abb. 3.13b, Spur 8). Die zweite Bande in der selben Spur im Western Blot bei etwa 30 kDa könnte auf eine Kreuzreaktion mit einer Kontamination hinweisen, welche im Zuge der Aufkonzentrierung angereichert wurde. Dies erschließt sich aus dem Vergleich der der Spur 8 mit den Spuren 6 und 7, in denen keine Kreuzreaktion des Antikörpers detektiert wurde (siehe Abb. 3.13). Diese Kreuzreaktivität erklärt sich durch die Verwendung eines polyklonalen Antiserums aus dem Kaninchen, das gegen das YscM2 gerichtet ist. Um dessen Spezifität zu erhöhen könnte man zum Beispiel zusätzlich eine Präadsorption gegen *E. coli* Zelllysate vornehmen. Dies könnte Kreuzreaktionen des Antiserums gegen *E. coli* Proteine eindämmen. Letztendlich konnten aus einem Liter Expressionskultur 5.45 mg His₆YscM2_{BT2-5} aufgereinigt werden.

3.1.2.2.2 Produktion und Aufreinigung von His₆YscM2_{BT1B} in *E. coli*

Die Expression und Aufreinigung der His₆YscM2_{BT1B} Variante erfolgte analog zu der Vorgehensweise bei der His₆YscM2_{BT2-5} Isoform. Dabei entsprach die Ausbeute von 6 mg Fusionsprotein aus einem Liter Bakterienkultur in etwa der bei der Herstellung von His₆YscM2_{BT2-5}. Die Abbildung 3.14 gibt eine schematische Darstellung des pWW3.2 Plasmides mit dem sequenzierten Integrationsort des Gens für His₆YscM2_{BT1B} wider.

Allerdings zeigten sich auch einige augenfällige Unterschiede während der Herstellung beider Isoformen. Vergleicht man den Zeitpunkt der Elution der beiden YscM2 Isoformen in der IMAC, fiel auf, dass das His₆YscM2_{BT1B} Protein bei geringeren Imidazolkonzentrationen (ca. 300 mM) eluierte. Demnach verursachen die Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen den beiden Sequenztypen (siehe Abb. 3.6) offensichtlich unterschiedliche Affinitäten der His-Fusionsproteine für die Ni-NTA Matrix. Dies könnte auf unterschiedliche Faltungen der Proteine zurückzuführen sein, so dass die His-Tags unterschiedlich stark exponiert werden. Ein weiteres Phänomen konnte beim Umpuffern der His₆YscM2 Proteine unter Verwendung von PD10 Entsalzungssäulen beobachtet werden. Hierbei wurden die aufkonzentrierten His₆YscM2 Proteinproben auf eine Sephadex[™] G-25 Matrix gegeben, um niedermolekulare Substanzen (z.B. Imidazol, kleinere Peptide) und Salze vom Protein abzutrennen. Die Säulenpassage der Proteine wird von der Matrix entsprechend ihrer molekularen Größe verzögert. Dabei eluierte das His₆YscM2_{BT2-5} Protein wesentlich früher als das His₆YscM2_{BT1B} Protein (Abb. 3.15).

Trotz der recht groben Auflösung der PD10-Säulen ist dies ein weiterer Hinweis auf einen sterischen Unterschied zwischen dem vermutlich größeren His₆YscM2_{BT2-5} und His₆YscM2_{BT1B}. In nachfolgenden Experimenten sollte deshalb die Frage nach der Größe der beiden Proteinvarianten beantwortet werden. Waren diese offensicht-

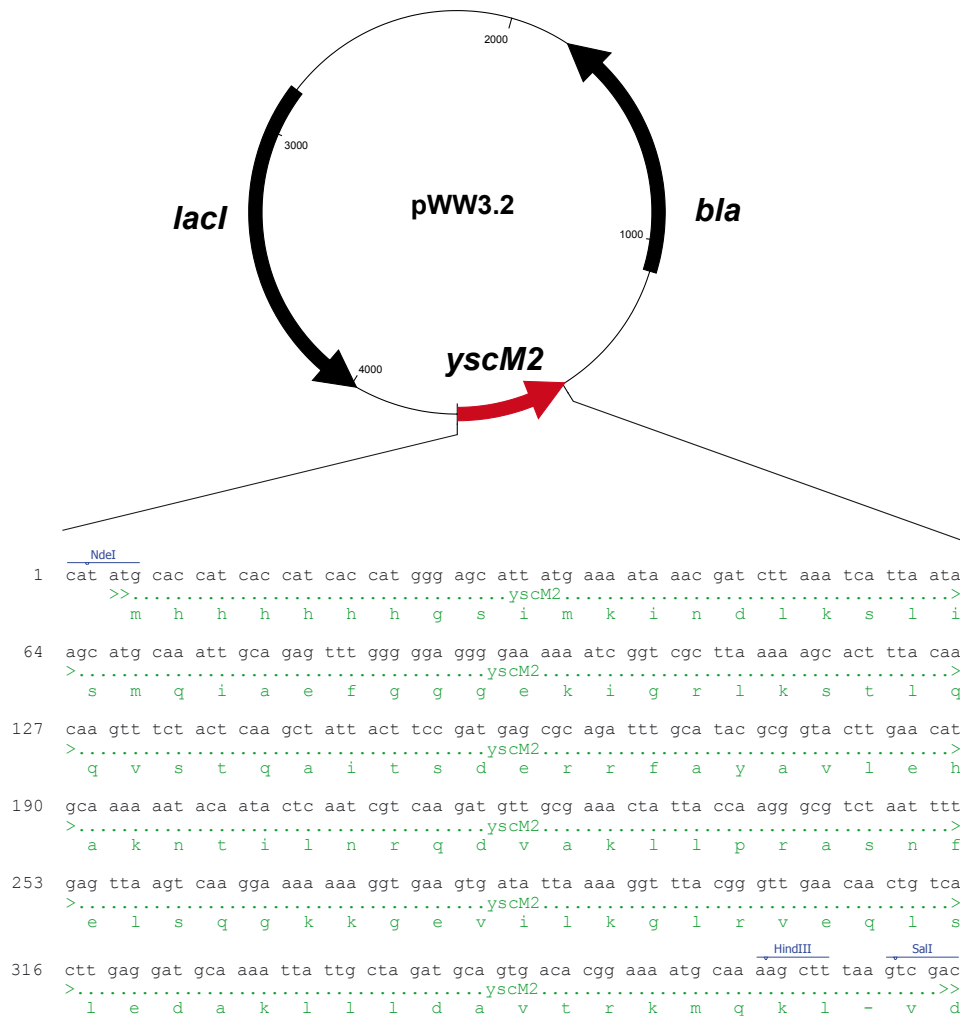


Abbildung 3.14: Expressionskonstrukt zur heterologen Expression der His₆YscM2_{BT1B} Sequenzvariante in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Dargestellt ist im oberen Bereich das Vektorrückgrat ausgehend vom *high copy number* Vektor pWS ([62]). Direkt darunter ist der sequenzierte Insertionsbereich mit seiner Nukleotidsequenz entsprechend dem *yscM2* Gen dargestellt. Ebenfalls zu entnehmen sind die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme NdeI und SalI. Die HindIII Schnittstelle wurde für den Nachweis der richtigen Ausrichtung des Inserts zum Vektor verwendet.

lichen Größenunterschiede auf Aggregation, also Fehlfaltung einer Spezies, oder unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten zurückzuführen? Eine geeignete Methode zur Beschreibung von Oligomerisierungszuständen von Proteinen ist die Gelfiltration. Diese wurde verwendet, um die Frage nach einem Größenunterschied zu beantworten.

Bevor die Ergebnisse dieser Experimente geschildert werden, soll an dieser Stelle die Aufreinigung der YscM2 Isoformen zusammengefasst werden. Ziel der heterologen Expression der beiden Proteine His₆YscM2_{BT2-5} und His₆YscM2_{BT1B} war die Produktion von Proteinmaterial im Milligrammbereich für die anschließenden Ana-

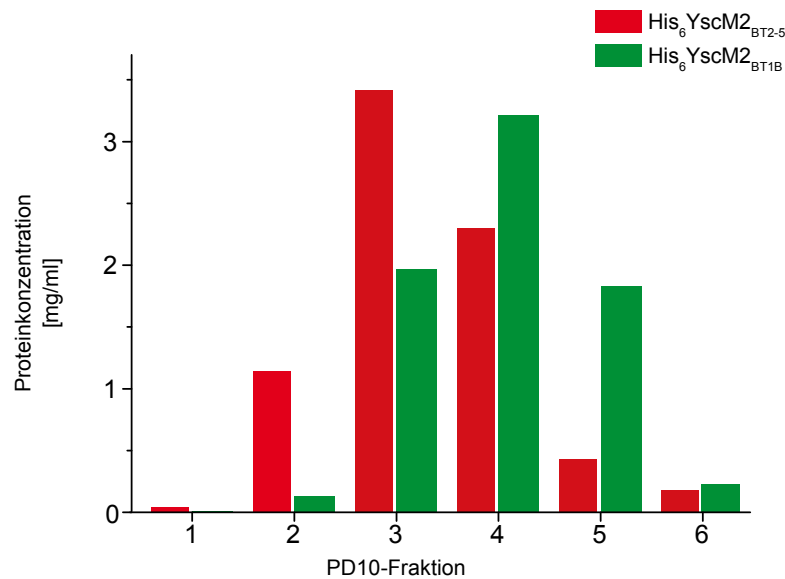


Abbildung 3.15: Elutionsprofil beider YscM2 Sequenztypen nach Passage der PD10-Entsalzungssäulen. Für die Umpufferung der beiden Fusionsproteine wurden 3 mg/ml His₆YscM2_{BT2-5} und 3.2 mg/ml His₆YscM2_{BT1B} eingesetzt. Die Balken stellen die Proteinkonzentration der jeweiligen Fraktion dar. rot: His₆YscM2_{BT2-5}; grün: His₆YscM2_{BT1B}

lysen zur Oligomerisierung der YscM2 Isoformen, was unter der Verwendung der beiden Expressionskonstrukte pPW3.2 (Abb. 3.9 für Plasmidkarte) und pWW3.2 (Abb. 3.14 für Plasmidkarte) erreicht wurde. Ausgehend von beiden Konstrukten wurden jeweils etwa 6 mg aus einem Liter Expressionskultur gewonnen. Die Reinheit der Proteine wurde mit mindestens 90% abgeschätzt. Im Zuge der Aufreinigung konnten im Vergleich der beiden Proteine zueinander zwei wesentliche Unterschiede beobachtet werden. Dazu zählt, dass das His₆YscM2_{BT2-5} Protein auffallend spät bei 400 bis 500 mM Endkonzentration Imidazol im Grundpuffer eluierte, während das His₆YscM2_{BT1B} Protein bereits bei 300 mM Imidazol eluierte. Aus dem Umstand, dass His₆YscM2_{BT2-5} während der Umpufferung auf PD10-Säulen wesentlich früher eluierte, als das His₆YscM2_{BT1B} Protein, könnten sich sowohl unterschiedliche Faltungen, als auch Oligomerisierungszustände der Proteine andeuten (Abb. 3.15).

3.1.3 Die Oligomerisierung der YscM2 Isoformen

Während der Reinigung der beiden Fusionsproteine konnten einige Beobachtungen gemacht werden, die einen Unterschied in der Oligomerisierung vermuten ließen. Kern dieses Abschnittes sind analytische Gelfiltrationsanalysen, bei denen die apparenten Molekulargewichte der Proteine durch den Vergleich mit Eichproteinen bestimmt wurden. Diese Bestimmungen lassen Rückschlüsse auf die Konformation und Oligomerisierungsgrade der Proteine zu. Der experimentelle Ablauf der Gelfiltration

ist dem Punkt 2.7 des Material und Methodenteils zu entnehmen. Nach erfolgter Kalibrierung der Säule wurden jeweils 100 μg der Fusionsproteine His₆YscM2_{BT2-5} und His₆YscM2_{BT1B} in getrennten Läufen aufgetragen und auf ihr Oligomerisierungsverhalten untersucht. Betrachtet man das Elutionsprofil beider Proteine in der Abbildung 3.16 (rote bzw. grüne Kurve), so wird ein deutlicher Unterschied in den Kurven ersichtlich. Das His₆YscM2_{BT2-5} Fusionsprotein eluiert in drei Peaks, von denen die beiden Hauptpeaks aus dem Vergleich mit den Eichkurven (gestrichelte Kurve) als Dimer (ca. 28 kDa, gekennzeichnet mit D) und Monomer (ca. 14 kDa, gekennzeichnet mit M) interpretiert werden können. Im Gegensatz dazu eluierte das His₆YscM2_{BT1B} Protein in einem einzigen Peak, was im Größenvergleich mit der Kalibrierung auf eine monomere Konformation hinweist (Abb. 3.16 grüne Kurve, M). Betrachtet man sich die Scheitelpunkte der beiden monomeren Peaks (3.16 rote und grüne Kurve, jeweils M) erkennt man sogar den Unterschied in der molekularen Größe zwischen beiden Isoformen (His₆YscM2_{BT2-5} = 14 kDa gegen His₆YscM2_{BT2-5} = 13 kDa), da dieser Größenbereich im maximalen Auflösungsbereich der verwendeten Säulenmatrix liegt.

Die Fraktionen aus den Gelfiltrationsläufen wurden im Anschluss vergleichend in einem Western Blot auf His₆YscM2 untersucht. In der Abbildung 3.17a und b sind die kolorimetrisch entwickelten Western Blot-Membranen dargestellt. Deutlich ist aus dem Vergleich der Einzelspuren 4 bis 9 der Abbildung 3.17(a) eine Detektion von His₆YscM2_{BT2-5} zu erkennen. Die Spur 5 repräsentiert die Fraktion A5, welche bei etwa 28 kDa eluierte. Bei einem monomeren Molekulargewicht von 14 kDa entspricht dies vermutlich einem dimeren Proteinkomplex. Spur 6 bis 7 entsprechen den Elutionsfraktionen A7 bis A8 und repräsentieren folglich das Monomer von His₆YscM2_{BT2-5}. Ergänzend gilt festzuhalten, dass die ersten drei Spuren des Western Blots keine Detektion des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins zeigen. Da diese Spuren die Fraktionen A8 bis A10 repräsentieren und diese wiederum dem ersten der drei Peaks des Elutionsprofils von His₆YscM2_{BT2-5} entsprechen, kann postuliert werden, dass dieser Peak nicht His₆YscM2_{BT2-5} repräsentiert. Im Gegensatz dazu konnte His₆YscM2_{BT1B} (Abb. 3.17(b)) hauptsächlich in den Spuren 6 und 7 detektiert werden. Das entspricht den Fraktionen A13 und A15, welche einem Monomer des His₆YscM2_{BT1B} mit einem Molekulargewicht von 14 kDa entsprechen. Da die Spuren 5 und 6 die intensivsten Banden im Western Blot der His₆YscM2_{BT2-5} Fraktionen lieferten zeigt dies, dass der Hauptanteil der His₆YscM2_{BT2-5} Proteine vermutlich als Dimer organisiert ist. Dem steht die vermutlich bevorzugte monomere Konformation des His₆YscM2_{BT1B} gegenüber (siehe Abb. 3.17(b) Spur 7).

Eine Aggregation von His₆YscM2_{BT2-5} kann ausgeschlossen werden, da in der Gelfiltration keine Komplexe größer als 28 kDa beobachtet wurden. Auch eine sehr frühe Elution, wie es bei großen Aggregaten der Fall ist, konnte nicht beobachtet werden. Da Faltungs- bzw. Oligomerisierungs-bedingte Unterschiede auch zu veränderten Protein/Protein-Wechselwirkungen führen können, sollte, wie im Folgenden

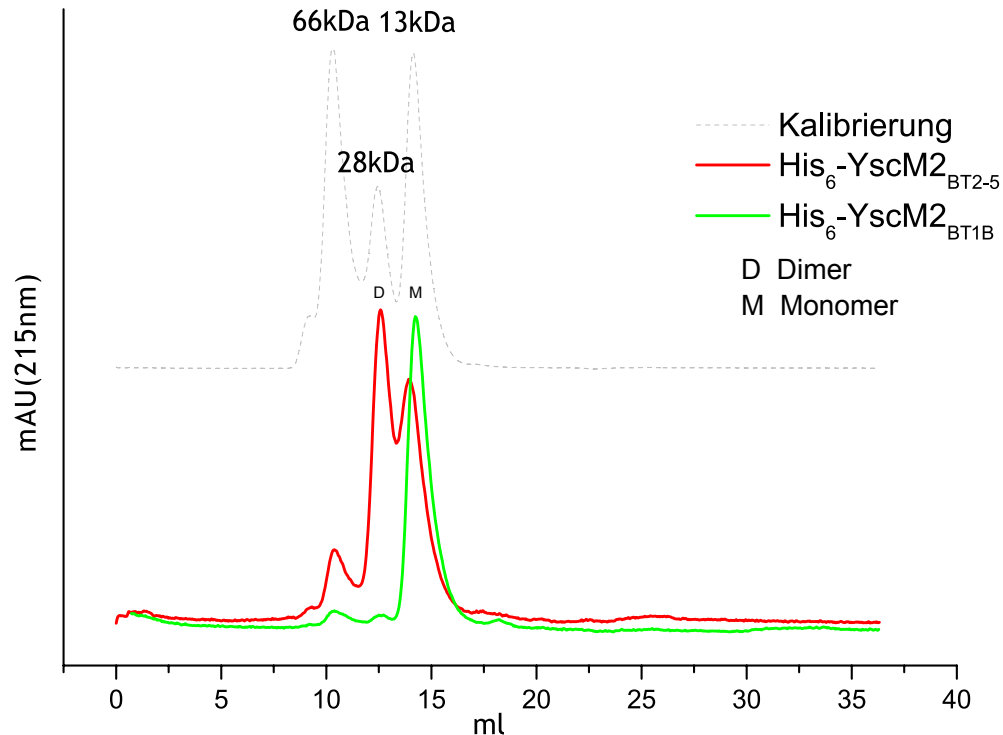


Abbildung 3.16: Oligomerisierung der beiden YscM2-Varianten in der Gelfiltration. Unter der Verwendung des Grundpuffers (25 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7.4) wurden jeweils 100 μ g der His₆YscM2_{BT2-5} und His₆YscM2_{BT1B} Proteine zur Trennung entsprechend ihrer apparenten Molekulargewichte auf eine Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Deutschland) geladen. Als Kalibrierung dienten jeweils 50 μ g BSA (66 kDa), Carboanhydrase (28 kDa) und Cytochrom C (13 kDa). Die Trennung erfolgte bei 4 °C unter Verwendung der Äkta Explorer FPLC. D kennzeichnet vermutliche Dimere von His₆YscM2_{BT2-5} (Dimer kalkuliert mit 28 kDa), die mit M gekennzeichneten Peaks könnten einer monomeren Fraktion des His₆YscM2_{BT2-5} (kalkuliert 14 kDa) und auch eines monomeren His₆YscM2_{BT1B} (kalkuliert mit 13 kDa) Proteins entsprechen.

dargestellt, mit SycH aus *Y. enterocolitica* ein solcher Interaktionspartner hergestellt werden. Darauf aufbauend sollten Analysen folgen, mit denen unterschiedliche Wechselwirkungen der beiden Sequenztypen im Verhältnis zu SycH dargestellt werden könnten. Im folgenden Abschnitt soll daher die heterologe Expression von SycH in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS und die Aufreinigung beschrieben werden.

3.2 Herstellung und Aufreinigung von SycH aus *Y. enterocolitica*

Im vorangegangenen Abschnitt wurden einige Hinweise auf Unterschiede zwischen den beiden YscM2 Proteinvarianten beschrieben. Ebenso wurde auf die Bedeutung eines geeigneten Testmodells zur Aufklärung der biologischen Auswirkungen dieser

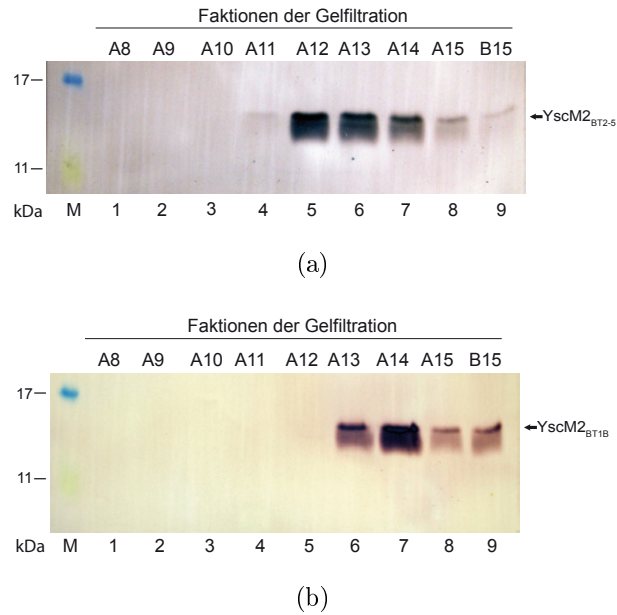


Abbildung 3.17: Western Blot zum Nachweis beider His₆YscM2 Isoformen in aufeinanderfolgenden Fraktionen der Gelfiltration. Die aufgetragenen Proteinmengen entsprechen den eluierten Konzentrationen der Einzelfraktionen. Zur Detektion der Proteine wurde ein polyklonaler Antikörper gegen YscM2 aus dem Kaninchen verwendet. (a) Elution des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins in der Gelfiltration. (b) Elution des His₆YscM2_{BT1B} Proteins in der Gelfiltration.

Sequenzpolymorphismen hingewiesen. Dazu wurde die Wechselwirkung des YscM2 Proteins mit seinem Chaperon SycH als ein solches biologisches System gewählt. Zur Herstellung des SycH Proteins konnten die Vorgaben der Publikation von Neumayer und Kollegen aus dem Jahr 2004 genutzt werden [71]. In dieser Publikation wird die Affinitätsmarker-freie (native) Synthese von SycH beschrieben. Das in der Publikation beschriebene pETuSycH Plasmid wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert und zum Zwecke einer Vorkultur über Nacht unter vorgegebenen Bedingungen [71] inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurde SycH anschließend über Nacht bei 27°C in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS im Fermenter exprimiert. Die genauen Bedingungen und Modifikationen sind dem entsprechenden Methodenteil unter Punkt 2.6.1.1 zu entnehmen. Die Rohausbeute betrug in etwa 75 mg/l. Nach Zellaufschluss war SycH gut löslich. Dies erschließt sich aus dem Vergleich der Spuren 1 und 2 der Abbildung 3.18. Das Pellet nach Zentrifugation (Abb. 3.18 Spur 1, P) entspricht den unlöslichen Bestandteilen. Die Intensität der entsprechenden SycH Bande bei 15 kDa ist sehr hoch, aber trotzdem wesentlich geringer als die der Bande in der benachbarten Spur 2, die dem löslichen Anteil nach Lyse und Zentrifugation entspricht. Demnach kann von einer guten Löslichkeit von SycH gesprochen werden. Da die Reinigung von SycH ohne Affinitätsmarker erfolgte, wurde im ersten Schritt eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von SycH sollte durch eine Fällung mit 30% (NH₄)₂SO₄ ein Großteil

anderer Proteine abgetrennt werden. Dies wird in der Abbildung 3.18 im Vergleich der Spuren 2 und 4 jedoch nicht ersichtlich. Zwar wurden einige Banden abgereichert (siehe dazu vergleichend Abb. 3.18, Spur 2 und 4), aber ein Konzentrierungseffekt, wie er in der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung zu erwarten wäre, fehlt (Abb. 3.18, Spur 2 und 4). Dass zumindest SycH erfolgreich gefällt werden konnte ergibt sich aus dem Vergleich der Spuren 3 und 4 der Abbildung 3.18. Während im Pellet der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung eine deutliche Bande zu erkennen ist (Abb. 3.18 Spur 4), fehlt diese im Überstand gänzlich (Abb. 3.18 Spur 3). Demnach könnte bei zukünftigen Aufreinigungen von SycH auf diesen Schritt verzichtet werden.

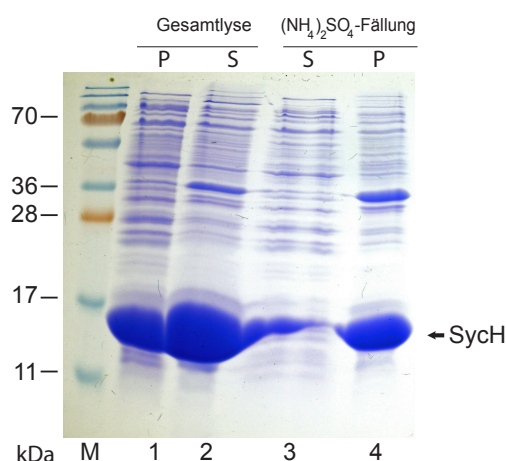


Abbildung 3.18: Löslichkeit und Ammoniumsulfatfällung von SycH. Spur 1 und 2 stellt die Lyse der SycH Expressionskultur dar (Spur 1: unlöslicher Bestandteil nach Lyse, P; Spur 2: löslicher Bestandteil, S), Spur 3 und 4 die Fällung mit 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Spur 3: Überstand der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung, S; Spur 4: Ammoniumsulfatpellet, P;).

Nach Waschen und Solubilisierung des Präzipitats erfolgte die Dialyse der Proteinelösung über Nacht bei 4°C. So konnte vor allem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, aber auch andere Salze in Vorbereitung auf die Ionenaustauschchromatographie entfernt werden. Aufgrund des niedrigen pI von SycH ($\text{pI} = 5.12$) konnte SycH über eine stabile Bindung an einen starken Anionenaustauscher (HiPrrep™ Q XL 16/10-Säule, GE Healthcare, Deutschland) bei pH 8.0 von störenden Kontaminationen wesentlich befreit werden. Über einen Gradienten von 100 mM bis 1 M NaCl wurde die Ionenstärke sukzessive erhöht und schwächer gebundene Proteine konnten somit vor SycH eluiert werden. Dies führte des weiteren zur Konzentrierung des Proteins. Nach der Ionenaustauschchromatographie musste die SycH-Präparation weiter über eine Gelfiltration von verbleibenden Kontaminationen gereinigt werden. Die Abbildung 3.19(b) fasst diese Aufreinigungen nochmals zusammen.

Abschließend wurden die wichtigsten Etappen der nativen Aufreinigung von SycH in einem Western Blot nachvollzogen (Abb. 3.20). Dabei erkennt man im Vergleich der Spuren 1 bis 3 den massiven Qualitätssprung in der Gelfiltration. Die zusätzlichen kreuzreaktiven Banden des gegen SycH gerichteten Antiserums in Spur

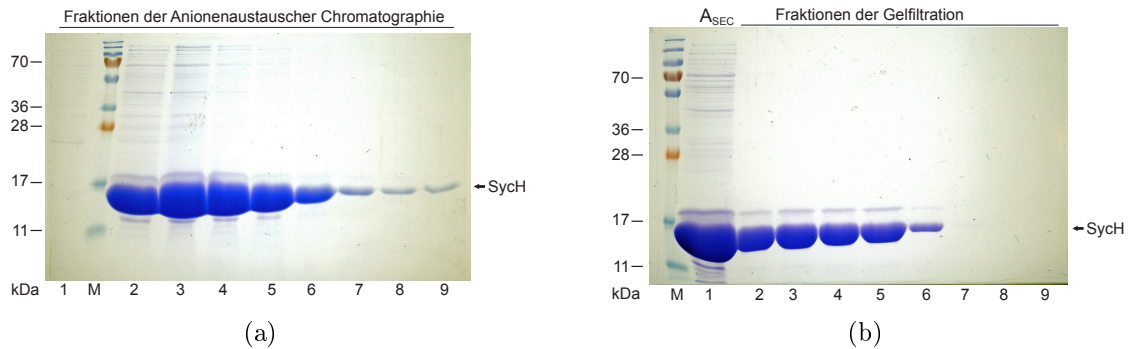


Abbildung 3.19: Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration von SycH. Die mit Coomassie gefärbten SDS-PAGE Gele geben eine Übersicht über die Reinigung von SycH. (a) Die dargestellten Spuren zeigen Fraktionen des Salzgradienten zur Elution von SycH. (b) Gelfiltration von SycH. Spur 1: Konzentrat der Ionenaustauscher-Fraktionen (A_{SEC}); Spur 2 bis 7: aufeinanderfolgende Fraktionen der Gelfiltration von SycH.

2 der Abbildung 3.20 verschwinden nach der Gelfiltration vollständig (Abb. 3.20 Spur 3). Zudem wird durch diesen immunologischen Nachweis des SycH Proteins die erfolgreiche Aufreinigung nochmals bestätigt.

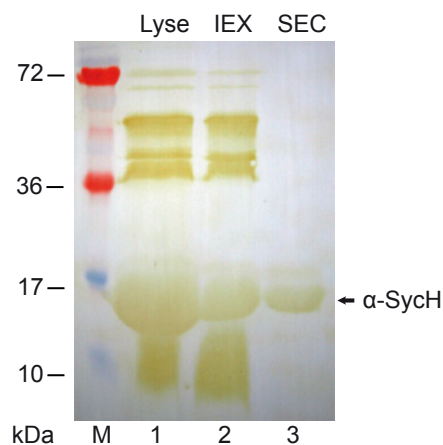


Abbildung 3.20: Aufreinigung von SycH im Western Blot. Immunologische Detektion von SycH unter Verwendung eines ployklonalen Antikörpers gegen SycH aus dem Kaninchen zu verschiedenen Zeitpunkten in der Herstellung des Proteins. Spur 1: Gesamtlyse der SycH Expressionskultur (Lyse); Spur 2: Konzentrat der gepoolten Fraktionen aus der Ionenaustauscherchromatographie (IEX); Spur 3: Fraktion nach Gelfiltration (SEC)

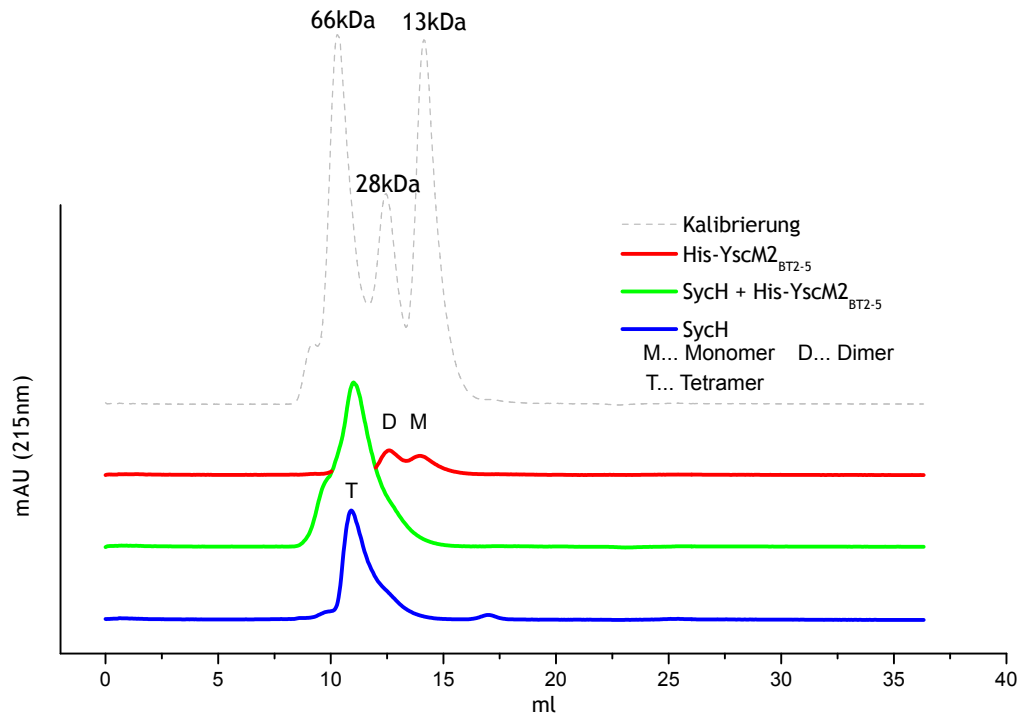
Zusammenfassend ließen sich 15 mg natives SycH Protein aus einem Liter Bakterienkultur gewinnen. Der Grad der Reinheit des gereinigten SycH Proteins konnte mittels Coomassie gefärbtem SDS-PAGE auf über 95% abgeschätzt werden.

3.3 Komplexbildung zwischen den YscM2 Varianten und SycH

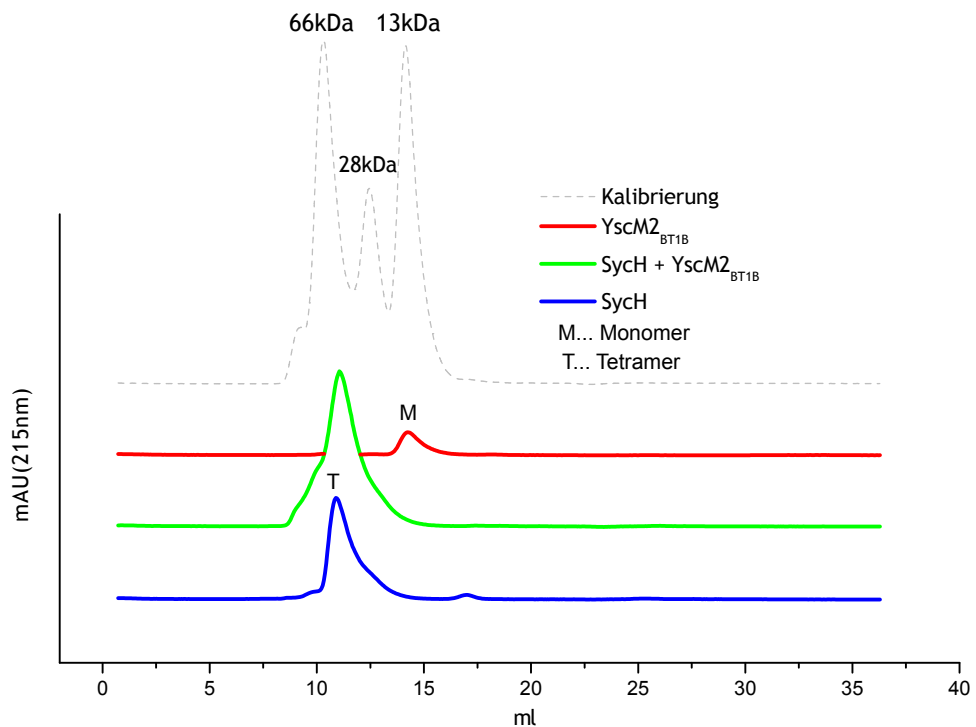
Für eine erste Analyse der Komplexbildung zwischen His₆YscM2_{BT2-5}, His₆YscM2_{BT1B} und SycH wurde eine Gelfiltration und ein natives Polyacrylamid-Gelsystem basierend auf einem gemeinsamen Grundpuffer (25 mM Hepes, 5 mM NaCl bei einem pH von 7.4) verwendet.

3.3.1 Analytische Gelfiltration und native PAGE der Komplexe

In der Gelfiltration wurde ein genähertes stöchiometrisches Verhältnis von einem Teil His₆YscM2 (Monomer entspricht 14 kDa) und zwei Teilen SycH (Monomer entspricht 15 kDa) verwendet. Dieses Verhältnis basiert auf der Kokristallisation von dimerem SycH im Komplex mit einem YscM2 Peptid [76]. Die Durchführung der Gelfiltration ist im Methodenteil unter Punkt 2.7 angegeben. In der folgenden Abbildung 3.21 sind zunächst die Elutionsprofile für die Einzelkomponenten und deren Gemische wiedergegeben.



(a)



(b)

Abbildung 3.21: Gelfiltrationsanalysen der YscM2 Varianten, von SycH und dem Gemisch aus SycH und YscM2. Elutionsprofile der Einzelkomponenten und der Mischung aus His₆YscM2_{BT2-5} und SycH (a) bzw. der Einzelkomponenten und der Mischung aus His₆YscM2_{BT1B} und SycH (b). Es wurden jeweils 100 µg der Einzelproteine eingesetzt. Das genäherte stöchiometrische Verhältnis im Gemisch zwischen His₆YscM2 und SycH betrug jeweils 1:2. rote Kurve: His₆YscM2_{BT2-5} bzw. His₆YscM2_{BT1B}; blaue Kurve: SycH; grüne Kurve: Gemisch aus His₆YscM2 und SycH. T... tetramere Teilfraktion, D... dimere Teilfraktion und M... monomere Teilfraktion

Betrachtet man die beiden roten Kurven in Abbildung 3.21(a) und (b), so erkennt man die typischen Elutionsprofile für His₆YscM2_{BT2-5} (Abb. 3.21(a) rote Kurve) und His₆YscM2_{BT1B} (Abb. 3.21(b) rote Kurve), wie sie ebenfalls der Abbildung 3.16 zu entnehmen sind. In beiden Fällen werden die Peaks, welche einem apparenten Molekulargewicht von 14 kDa (His₆YscM2_{BT2-5}) und 13 kDa (His₆YscM2_{BT1B}) entsprechen, durch die Zugabe von SycH im Gemisch wegtitriert. Dies wird durch das Verschwinden der mit M gekennzeichneten Scheitelpunkte der monomeren Teilfraktionen beider His₆YscM2 Proteine in den roten Kurven der Abbildungen 3.21(a) und (b) deutlich. Die beiden Peaks bei etwa 13 kDa gehen jeweils in einen Hauptpeak bei etwa 60 kDa über (Abb. 3.21(a) und (b) grüne Kurven). Das lässt die Interpretation zu, dass beide monomeren His₆YscM2 Proteine mit SycH wechselwirken und stabile Komplexe bilden. Für die vermutlich dimere Teilpopulation des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins lässt sich diese Beobachtung nicht gänzlich beweisen, da der Peak für das His₆YscM2_{BT2-5} Dimer mit der Kurve des Gemisches aus His₆YscM2_{BT2-5} und SycH überlagert (siehe Abb. 3.21(a) rote und grüne Kurven). Zusätzlich lassen sich aus dieser Abbildung auch Rückschlüsse auf den Oligomerisierungszustand von SycH ableiten. Aus der Betrachtung des Elutionsprofils von SycH (Abb. 3.21(a) und (b) blaue Kurven, Scheitelpunkt mit T gekennzeichnet) erhält man ein apparentes Molekulargewicht von etwa 60 kDa. Dies würde auf ein Tetramer hinweisen, das rein rechnerisch aus vier 15 kDa Untereinheiten des SycH Monomers besteht müsste. Das verwundert etwas, da SycH laut Literatur ein Homodimer mit einer resultierenden Größe von etwa 30 kDa sein müsste [105]. Da es nicht zu einer Verschiebung der Scheitelpunkte der grünen Komplexkurve (SycH-His₆YscM2 Komplex) im Vergleich zur blauen SycH Kurve kommt, wird vermutlich das SycH Protein nicht vollständig komplexiert. Dies könnte durch eine Fehlabschätzung der ermittelten und somit verwendeten Proteinkonzentrationen für SycH oder YscM2 begründet sein. Des Weiteren könnte die Differenz im Molekulargewicht zwischen tetramerem SycH allein und dem Komplex aus SycH-Tetramer und YscM2 mit der hier verwendeten Gelfiltrationssäule nicht genügend aufgelöst werden. Vergleicht man dennoch in der Abbildung 3.21a und b die grünen Komplexkurven und die blauen Kurven für SycH, so erkennt man, dass die grüne Kurve des Komplexes wesentlich eher ansteigt als die blaue Kurve, was durch das Entstehen einer Schulter in beiden grünen Kurven der Komplexe verdeutlicht wird. Beide Schultern verweisen auf Komplexe mit einem Molekulargewicht > 66 kDa hin, was auf Komplexe eines tetrameren SycH mit einer zweifachen oder einfachen Beladung mit einem His₆YscM2 Protein hinweist. Um zu bestätigen, dass die Schultern durch Komplexbildung entstanden sind, müssen in einem Western Blot beide Komponenten in den jeweiligen Fraktionen detektiert werden. Dazu wurden die Elutionsfraktionen aus der Gelfiltration auf denaturierende SDS-Gele aufgetragen und nach Western Blotting mit Antiseren gegen SycH und YscM2 entwickelt. In der Abbildung 3.22 zeigt sich deutlich die Verschiebung der His₆YscM2 Banden beider Isoformen im Vergleich zwischen Einzelprotein

und im Gemisch mit SycH. Für His₆YscM2_{BT2-5} bedeutet das eine Verschiebung der Hauptfraktion von Fraktion A12/13 zu A10/11 (siehe Abb. 3.22 Spur 5 und 6 des Einzelproteins und Spuren 3, 4 des Gemisches I). Für His₆YscM2_{BT1B} zeigt sich sogar eine noch deutlichere Verschiebung im Elutionsprofil. Während die Hauptfraktion des Einzelproteins bei Fraktion A14 zu erkennen ist, verschiebt sich diese unter der Zumischung mit SycH um maximal 4 Spuren zu einer Elution in der Fraktion A10 (siehe Abb. 3.22 Spur 3 des Einzelproteins und Spuren 10, 11 des Gemisches II). Daraus ergibt sich der immunologische Beweis für die Wechselwirkung zwischen beiden His₆YscM2 Isoformen und SycH. Aus der Betrachtung des Western Blots zu SycH lässt sich des Weiteren der hohe Oligomerisierungszustand des Proteins sehr gut an der frühen Elution des Proteins erkennen (Abb. 3.22 Spur 3 bzw. Fraktion A10). Da auch die Majorität von SycH in der Fraktion A11 des selben Blots zu erkennen ist, kann im Vergleich zur Kalibrierung von einem Molekulargewicht des SycH Proteins von ca. 60 kDa ausgegangen werden. Wird das SycH im Gemisch mit His₆YscM2 gebunden, verschiebt sich die Elution des SycH ebenfalls zu früheren Fraktionen. Zusätzlich wird die Wechselwirkung zwischen den His₆YscM2 Proteinen und SycH durch die Doppeldetektion in den jeweiligen Fraktionen der Gelfiltration nochmals untermauert.

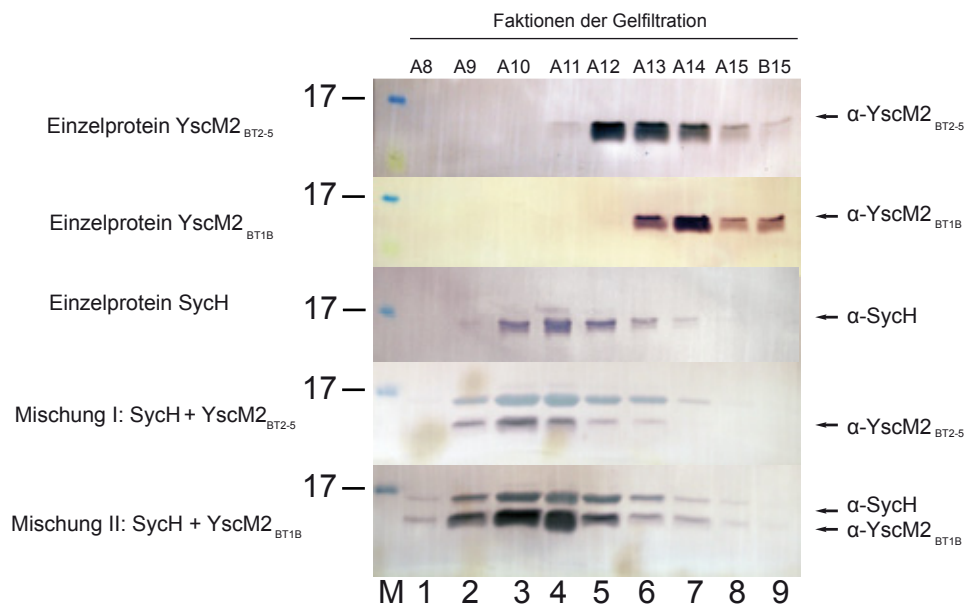
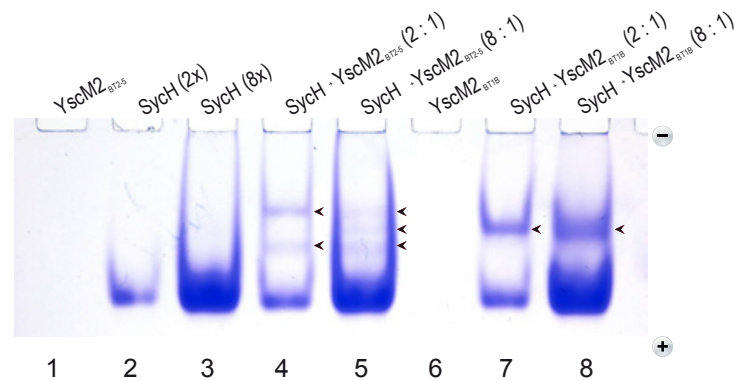


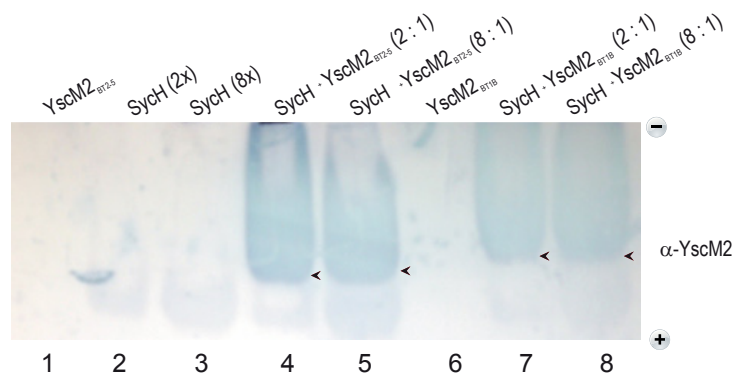
Abbildung 3.22: Western Blot der YscM2 Sequenztypen, SycH und deren Komplexe. Zur Gelfiltration der Einzelproteine wurden jeweils 100 µg von His₆YscM2_{BT2-5}, His₆YscM2_{BT1B} und SycH eingesetzt. Für die Komplexbildung zwischen His₆YscM2 und SycH wurden ein ungefähres stöchiometrisches Verhältnis von 1 : 2 nach Wilharm *et al.* gewählt [120]. Im Western Blot wurden polyklonale Antikörper gegen YscM2 und SycH aus dem Kaninchen eingesetzt. In der Doppeldetektion von SycH und YscM2 wurde zunächst auf SycH detektiert (kolorimetrische Reaktion beruhte auf DAP), um den gestrippten Western Blot ein zweites mal auf YscM2 zu detektieren (kolorimetrische Detektion beruhte auf BCIP).

Ein weiteres System zur Betrachtung von Protein/Protein-Wechselwirkungen ist die Acrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen. Dabei werden die Proteine und Proteinkomplexe entsprechend ihrer apparenten Molekulargewichte separiert, aber ohne den Einsatz von SDS, Mercaptoethanol und Kochen der Proben vor dem Auftragen. Somit nehmen die Einzelmoleküle und Gemische ihre native Oligomerisierung ein und werden schonend im elektrischen Feld aufgetrennt. Da hier kein SDS oder Coomassie als Ladungsträger zur Anwendung kommt sind die Einstellung des pH-Wertes und die Polung des Gelsystems essentielle Parameter. Im hier verwendeten Gelsystem nach Wilharm *et al.* [120] wird im nativen Gelsystem ein pH-Wert von 7.4 eingestellt. So können die His₆YscM2 Fusionsproteine mit ihrem pI ≥ 9 bei diesem pH-Wert und einer entsprechenden Polung des Geles nicht in das selbige einwandern. Das passiert nur, wenn diese vorher mit SycH (pI von 5.13) einen stabilen Komplex bilden, der eine Nettoladung liefert, die das Einwandern ermöglicht. Die Abbildung 3.23(a) stellt das Ergebnis der nativen Gelelektrophorese in Form eines Coomassie gefärbten Gels dar. Abbildung 3.23(b) zeigt einen Western Blot des Gels, bei dem der Nachweis der His₆YscM2 Proteine mit einem polyklonalen Antiserum gegen YscM2 durchgeführt wurde. Der experimentelle Ablauf ist dem Punkt 2.5.4 zu entnehmen.

Nach der Färbung des Gels mit Coomassie blieben die beiden Spuren für die His₆YscM2 Proteine leer (Abb. 3.23(a) Spur 1 und 6). Dies erklärt sich, wie oben erwähnt, aus der Kombination der Polung des Gels und der Wahl des Puffersystems (pH 7.4), die eine Einwanderung von YscM2 Proteinen verhindert. In den Spuren 2 und 3 erkennt man deutlich die SycH-Bande. Ebenfalls ist die Vervierfachung der aufgetragenen SycH-Menge aus dem Vergleich der Spur 2 und 3 zu erkennen. Werden nun die Gemische aus His₆YscM2 und SycH aufgetragen, erkennt man zusätzliche Proteinbanden (Abb. 3.23(a) Spuren 4, 5, 7 und 8, Pfeile). Im Fall des Gemisches aus His₆YscM2_{BT2-5} und SycH (Abb. 3.23(a) Spur 5 und 6, Pfeile) entsteht ein Bandenmuster, das mehrere Komplexe mit unterschiedlichen Größen vermuten lässt. Im Gegensatz dazu lässt sich aus den Spuren 7 und 8 die Entstehung eines einzelnen Komplexes aus His₆YscM2_{BT1B} und SycH postulieren (Abb. 3.23(a) Spur 7 und 8, Pfeile). Dieser vermutliche Komplex ist im Vergleich zu den Oligomerisierungszuständen des Gemisches aus His₆YscM2_{BT2-5} und SycH (Abb. 3.23(a) Spuren 5 und 6, Pfeile) in der Größe unterschiedlich. Das könnte sich aus dem Größenunterschied der beteiligten His₆YscM2 Proteine erklären. Schließlich ist das His₆YscM2_{BT1B} Protein mit seinem verkürztem C-Terminus und 13 kDa etwas kleiner als His₆YscM2_{BT2-5} mit 14 kDa. Untermauert wird die Interpretation, dass die His₆YscM2 Proteine an der Komplexbildung beteiligt sind, durch den Western Blot gegen YscM2 in der Abbildung 3.23(b). Die Spuren 1 und 6, in denen die YscM2 Isoformen alleine geladen wurden, zeigen keine Signal, während die Spuren 4, 5, 7 und 8 deutliche Signale ergeben. Auch der Größenunterschied zwischen den Komplexen mit den beiden His₆YscM2 Varianten ist deutlich an den unterschiedlichen Bandenhöhen zu erken-



(a)



(b)

Abbildung 3.23: Native Hepes-Gelelektrophorese (pH = 7.4) der YscM2 Isoformen, SycH aus *Y. enterocolitica* WA-314 und deren Mischungen. Zur Auftrennung der Einzelproteine wurden jeweils 5 μ g von His₆YscM2_{BT2-5} (Spur 1) und His₆YscM2_{BT1B} (Spur 6) bzw. 10 μ g (2x) (Spur 2) und 80 μ g (8x) (Spur 3) SycH eingesetzt. Für die Komplexbildung zwischen His₆YscM2 und SycH wurden die beiden Verhältnisse 1 : 2 (Spur 4 und 7) und 1 : 8 (Spur 5 und 8) gewählt. Bei einem pH von 7.4 und der angewandten Polung des Geles (rechts vom jeweiligen Bild dargestellt) konnten die His₆YscM2 Proteine nicht in das Gel einwandern. (a) Coomassie gefärbtes Gel. (b) Entsprechender Western Blot des Gels mit identischer Beladung entwickelt unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums gegen YscM2 aus dem Kaninchen. Die entstandenen Komplexe sind mit einem Pfeil markiert.

nen (siehe vergleichend 3.23(b) Spur 4 und 5 mit 7 und 8).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in der Gelfiltration und nativen PAGE beide His₆YscM2 Isoformen einen Komplex mit SycH bilden. Zusätzlich lassen sich Unterschiede in der Beschaffenheit der Komplexe zwischen den beiden His₆YscM2 Isoformen vermuten. Während das monomere His₆YscM2_{BT1B} Protein nur einen stabilen Komplex mit SycH ausbildet (Abb. 3.23 Spur 7 und 8), entste-

hen bei der Komplexbildung des Dimer-Monomer-Gemisches des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins mindestens drei Komplexe (3.23 Spur 4 und 5). Über die Gestalt der Komplexe lässt sich nur mutmaßen. Geht man von einem festen SycH Tetramer aus (Abb. 3.21a/b, blaue Kurve), so kommt ein SycH-His₆YscM2 Verhältnis von 4 : 2 in Frage, was einem resultierenden Molekulargewicht von 88 kDa entspricht und somit die Schulter im Peak der Gemische erklären könnte (Abb. 3.21a/b, jeweils grüne Kurven). Weiter ist ein Komplex aus vier Teilen SycH und einem Teil YscM2 Protein möglich. Dies entspräche rechnerisch einem Komplex von 74 kDa und wäre ebenfalls mit der Schulter vereinbar (ebenfalls grüne Kurve in Abb. 3.21 a und b). Die Komplexbildung soll im Folgenden näher betrachtet werden. Dafür sollen die Eigenschaften der Komplexe in puncto Affinität von SycH zu den beiden YscM2 Isoformen im Vordergrund stehen. Eine dafür geeignete Methode stellt die *surface plasmon resonance* Spektroskopie dar, welche mit den beteiligten Komponenten unter Komplex-bildenden Bedingungen durchgeführt wurde.

3.3.2 Quantitative Betrachtung der Affinität von SycH zu den YscM2 Isoformen

Methoden wie die Gelfiltration und native Gelelektrophorese sind besonders geeignet, um Veränderungen des apparenten Molekulargewichtes von Komplexen und deren Einzelkomponenten darzustellen. Dennoch können diese Methoden keine Gleichgewichtsreaktionen von Prozessen beschreiben, da mit den Trennungsprozessen ständig Veränderungen im Gleichgewicht der beteiligten Komponenten im Stoffgemisch verbunden sind. Um sich der Gleichgewichtsreaktion der vermuteten Komplexbildung zwischen den His₆YscM2 Isoformen und SycH zu nähern, sollte jeweils eine Komponente immobilisiert werden und unter konstantem Fluss der anderen Komponente eine Gleichgewichtseinstellung dargestellt werden. Dafür wurde die Methode der *surface plasmon resonance* Spektroskopie genutzt, die mit einem BiacoreX100 Gerät (GE Healthcare, Deutschland) durchgeführt wurde. Mit diesem Gerät wurde die Affinität des SycH Proteins zu den einzelnen His₆YscM2 Isoformen ermittelt, um festzustellen, ob eine Isoform in der Komplexbildung bevorzugt wird, was sich in unterschiedlichen Komplexbildungskinetiken auswirken müsste. Dazu wurden nach den Vorgaben des Geräteherstellers und den diesbezüglichen Vorarbeiten von Swietnicki *et al.* [105] eine *surface plasmon resonance* Spektroskopie durchgeführt. In der Arbeit von Swietnicki *et al.* wurde die Wechselwirkung eines YscM2 Proteins aus *Y. enterocolitica* WA-314 und eines SycH Proteins aus *Y. pestis* untersucht. Hierbei konnten sehr schnelle Assoziations- und Dissoziationsraten des Analyten SycH für die Wechselwirkung mit dem Liganden YscM2 beschrieben werden. Dabei wurde von den Autoren auf die Einhaltung eines speziellen stöchiometrischen Verhältnis zwischen SycH und YscM2 verzichtet und ein Verhältnis von 1 : 1 nach Langmuir angenommen [105].

Aufbauend auf diesen Vorarbeiten wurde ein methodischer Ablauf für die hier vorliegende Arbeit entwickelt, der dem Material und Methodenteil dieser Arbeit unter Punkt 2.8 zu entnehmen ist. Es wurden die Signalstärken (*response units*, RU) der Wechselwirkung des in Lösung befindlichen Analyten SycH mit den immobilisierten Liganden His₆YscM2_{BT2-5} bzw. His₆YscM2_{BT1B} ermittelt. Dazu wurde der Analyt in ansteigenden Konzentrationen (0.1 µM, 0.5 µM, 0.75 µM, 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 7.5 µM, 10 µM, 12.5 µM, 25 µM und 50 µM) auf den Liganden bei 37°C gegeben und die Assoziation, das Einstellen des Gleichgewichts zwischen freien und gebundenen Analyten und die Dissoziation in Echtzeit durch das Gerät ermittelt. In der Abbildung 3.24 sind beispielhaft die Sensogramme für die Wechselwirkung des Analyten SycH mit dem Liganden His₆YscM2_{BT2-5} dargestellt.

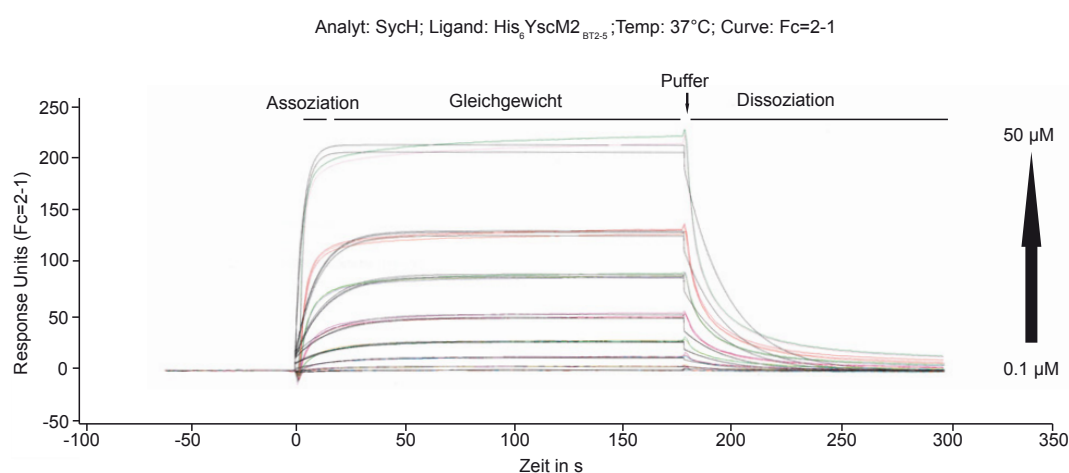


Abbildung 3.24: Sensogramm der Wechselwirkung von SycH mit der His₆YscM2_{BT2-5} Isoform. Graphische Darstellung zur Bestimmung der Affinitätskonstante der Wechselwirkung des Analyten SycH zum Liganden His₆YscM2_{BT2-5}. Die einzelnen Sensogramme wurden mit Hilfe der BiacoreX100 Kontrollsoftware (GE Healthcare, Deutschland) bei ansteigenden SycH Konzentration von 0.1 bis 50 µM unter Verwendung von His₆YscM2-gekoppelten CM5-Chips (GE Healthcare, Deutschland) ermittelt und anschließend zur besseren Betrachtung zusammengefasst. Wiedergegeben ist jeweils die Response Differenz (zur Referenzflußzelle, Fc=2-1) nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit (s).

Da die Sensogramme für die Interaktion des SycH Proteins mit den beiden His₆YscM2 Isoformen, abgesehen von den unterschiedlichen Signalintensitäten, identisch waren, ist zur Illustration alleinig das Sensogramm der Wechselwirkung des Analyten SycH mit dem Liganden His₆YscM2_{BT2-5} gezeigt. In beiden Sensogrammen ist eine schnelle Assoziation des Analyten am Liganden zu erkennen. Danach erfolgt eine stabile Gleichgewichtsphase, welche erst durch die Zugabe von Laufpuffer (Pfeil) unterbrochen wird. Abschließend stellt sich eine, im Vergleich zur Assoziation ebenfalls schnelle Dissoziationsphase ein. Letztendlich entsprachen die Sensogramme im Profil den bereits publizierten Ergebnissen der Arbeit von Swietnicki und

Kollegen [105]. Die erhaltenen Messergebnisse entsprechen jeweils Dreifachmessungen, welche anschließend zur Ermittlung der Bindungskonstanten (K_D) für die jeweiligen Komplexe dienten. Dafür wertete die BiaEvaluation Software 1.1 (GE Healthcare, Deutschland) die Sensogramme unter Verwendung der Formel 3.1 aus.

$$R_{eq} = \frac{K_A \cdot C \cdot R_{max}}{(K_A \cdot C \cdot n + 1)} \quad (3.1)$$

Dabei wurden die Parameter für R_{max} , die Kinetiken der Assoziation (K_A) und die Konzentration des Analyten aus den Kurven des Sensogramms für die Wechselwirkung von SycH (Analyt) mit den beiden YscM2 Proteinen (Ligand) ermittelt und der Wert für R_{eq} dem *Steady State* Modell folgend gegen die Konzentration des Analyten (C) in einem Diagramm aufgetragen. Aus diesem Diagramm wurde der K_D -wert ermittelt, bei dem das Verhältnis zwischen gebundenem und freien Analyten genau 50 : 50 betrug. Die Abbildung 3.25 gibt diesen Punkt für die jeweiligen Liganden His₆YscM2_{BT2-5} (Abb. 3.25a) und His₆YscM2_{BT1B} (Abb. 3.25b) mit den entsprechenden (K_D) Werten in μM wieder. Zusätzlich ist die maximal erreichte Signalstärke (R_{max} in RU) der Wechselwirkung angegeben.

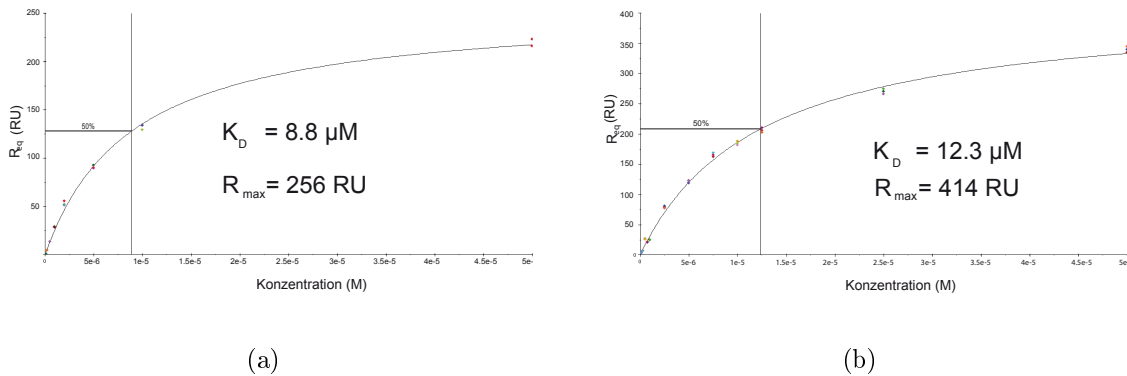


Abbildung 3.25: Bestimmung der Affinität von SycH zu den His₆YscM2 Isoformen. Graphische Darstellung zur Bestimmung der Affinitätskonstanten der Wechselwirkung des Analyten SycH mit den Liganden His₆YscM2_{BT2-5} (a) und His₆YscM2_{BT1B} (b). Die einzelnen Bindungskonstanten wurden mit Hilfe des BiacoreX100 (GE Healthcare, Deutschland) bei ansteigenden SycH Konzentration von 0.1 bis 50 μM unter Verwendung von His₆YscM2-gekoppelten CM5-Chips (GE Healthcare, Deutschland) mit Hilfe der BiaEvaluation Software 1.1 ermittelt. Die ermittelten Bindungskonstanten (K_D in μM) und maximalen Signalstärken (R_{max} in RU) sind den jeweiligen Teilabbildungen zu entnehmen.

Unter den Vorgaben der ermittelten Sensogramme wurde für die Gleichgewichtseinstellung des Analyten SycH aus *Y. enterocolitica* WA-314 mit dem His₆YscM2_{BT2-5} Protein eine Bindungskonstante (K_D) von 8.8 μM ermittelt. Für die Wechselwirkung

von SycH mit His₆YscM2_{BT1B} ergaben die Berechnungen eine $K_D = 12.3 \mu\text{M}$. Vergleicht man die Affinität von SycH zu beiden YscM2 Isoformen stellt man keine deutlichen Unterschiede fest. Dem steht die interessante Beobachtung entgegen, dass wesentlich mehr SycH-Moleküle an die monomere Form des YscM2_{BT1B} binden, als an His₆YscM2_{BT2-5}, welches in einer Mischung aus Monomer und Dimer vorliegt. Dies wird durch den Vergleich der maximal erreichten Signalstärken (R_{max} in RU) zwischen den beiden Sequenztypen sichtbar. Da im Fall von YscM2_{BT1B} der R_{max} 414 RU beträgt, ist dieser $1.6\times$ höher als im Fall der Wechselwirkung von SycH mit YscM2_{BT2-5} ($R_{max} = 256$ RU). Vermutlich liegt die Begründung in den unterschiedlichen Oligomerisierungen der YscM2 Isoformen. Im Fall von His₆YscM2_{BT1B} werden ausschließlich Monomere immobilisiert, die komplett mit SycH komplexieren. Im Dimer-Monomer Gemisch des His₆YscM2_{BT2-5} binden ebenfalls nur die Monomere an SycH und die Dimere eben nicht. Somit kann eine vergleichbare Signalstärke zum rein monomeren YscM2_{BT1B} nicht erreicht werden, da die ebenfalls immobilisierte dimere Subpopulation des YscM2_{BT2-5} nicht an der Wechselwirkung mit SycH teilnimmt. Um diesen Befund zu verifizieren sollte in einem Anschlussexperiment das SycH Protein als Ligand auf einem CM5-Chip immobilisiert werden, um die YscM2 Proteine als Analyten in ihrer Affinität zu SycH zu betrachten. Dies schlug fehl, da bei der Etablierung des SycH-gekoppelten CM5-Chips keine geeigneten Bedingungen zur Regeneration der Chipoberfläche gefunden wurden. Somit würden nach jedem Messzyklus gebundene Analyten zurückbleiben und in den Folgemessungen falsche Signalintensitäten vermitteln. Warum die Regeneration fehlschlug, lässt sich nur schwer beantworten, da sowohl hohe Ionenstärken (2 M NaCl, 4 M MgCl₂) als auch extreme pH-Werte (HCl pH = 1 und NaOH pH=10) keine geeigneten Bedingungen für die Regenerierung ergaben. Hierdurch darf der gebundene Ligand nicht gänzlich denaturiert werden und zusätzlich darf die Dextran-beschichtete Oberfläche des Chips nicht zerstört werden.

Des Weiteren konnten die His₆YscM2 Proteine nicht auf einem Ni-NTA Chip immobilisiert werden. Grund hierfür war die Bildung von Aggregaten auf dem Chip, die einer derart rigiden Regeneration bedurften, dass die Integrität des Chips für eine längere Verwendung nicht zu gewährleisten war. Somit stehen zur Bewertung der Affinität des SycH Proteins zu den YscM2 Sequenztypen allein die Experimente mit den His₆YscM2 Proteinen als Liganden und SycH als Analyt zur Verfügung. Diese sind zwar reproduziert, dennoch fehlen die komplementären Experimente bestehend aus SycH als Ligand und den His₆YscM2 Proteinen als Analyten. Diese könnten die ähnlichen Affinitäten bestätigen. Zudem konnte auch der Einfluss der unterschiedlichen C-Termini auf die Wechselwirkung mit SycH nicht untersucht werden, da die gerichtete Immobilisierung unter Verwendung eines Ni-NTA-Chips fehlschlug.

Als Ergebnis dieser Experimente ist der Nachweis zu sehen, dass SycH zu beiden Formen eine vergleichbare Affinität zeigt, und dass die monomere Isoform des YscM2 Proteins (YscM2_{BT1B}) mehr SycH Moleküle in einen Komplex bindet, als das Dimer-

Monomer Gemisch des YscM2_{BT2-5} Sequenztyps. Des Weiteren ist zu vermuten, dass die dimere Subpopulation von YscM2_{BT2-5} keine Komplexbildungskompetenz für SycH besitzt. Um sich der Komplexbildung auf einem alternativen Weg zu nähern und um zu versuchen, den Einfluss der unterschiedlichen Konformationen dennoch aufzuklären, wurden die gereinigten Proteine mit Hilfe einer Struktur-auflösenden Methode einzeln und im Komplex miteinander untersucht. Im Folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Röntgenkleinwinkelstreuanalysen näher erläutert.

3.3.3 Die Struktur von SycH und des SycH-YscM2-Komplexes in Lösung

Die Röntgen-Kleinwinkelstreuanalyse (*small angle X-ray scattering* SAXS) ist eine strukturgebende Technik, bei der hoch-energetische Synchrotronstrahlung verwendet wird, um Parameter zur Berechnung der Beschaffenheit und Gestalt von Molekülen in einer Lösung zu erhalten. Die Methode umfasst im Wesentlichen zwei Abschnitte, die Ermittlung von Molekül-spezifischen Streubildern und deren bioinformatische Verarbeitung zur abschließenden Modellierung von Molekülstrukturen. Damit die Streukurven verwendet werden können, muss die Proteinlösung möglichst homogen sein, was auch als monodispers bezeichnet wird. Das Gegenteil, eine polydisperse Lösung führt zu Streubildern, die für eine exakte Berechnung der Raumgestalt von Molekülen zu viele offene Freiheitsgrade zulassen würden. Zur Validierung der Modelle wird aus den Modellierungen wiederum eine virtuelle Streukurve berechnet, welche gegen die reell im Experiment detektierte Streukurve gefittet wird. Das Modell mit der besten Übereinstimmung zwischen den beiden Streukurven wird als Molekülhülle vorgeschlagen. Die Koordinaten für diese Molekülhülle wurden anschließend mit einer speziellen Version des RasWin-Programmes³ dargestellt. Theorie und Durchführung sind im Methodenteil dieser Arbeit unter Punkt 2.9 zusammengefasst. Mit Hilfe dieser Technik sollten zunächst die Konformationsunterschiede zwischen den beiden YscM2 Isoformen betrachtet werden. Aus der Gelfiltration wurde ein Dimer-Monomer Gemisch für His₆YscM2_{BT2-5} postuliert, während His₆YscM2_{BT1B} ein reines Monomer ist. Mittels SAXS wurden Streukurven für beide Isoformen mit jeweils gleichen Proteinkonzentrationen ermittelt. Dabei konnte letztlich nur die Gestalt der His₆YscM2_{BT1B} Hülle modelliert werden (siehe Abb. 3.26), da sich die His₆YscM2_{BT2-5} Proteinlösung als zu stark polydispers erwies. In der folgenden Abbildung 3.26 ist die *ab initio* modellierte Molekülhülle des His₆YscM2_{BT1B} Proteins zu sehen, welche mit Hilfe der Programme des ATSAS Datenpaketes ermittelt wurde [56].

Aus dieser Abbildung ist eine globuläre Gestalt der Hülle zu erkennen. Dennoch

³Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Version des RasMol Programmes, welches aus lizenzrechtlichen Gründen nur auf den Servern der EMBL Außenstation Hamburg betrieben werden darf.

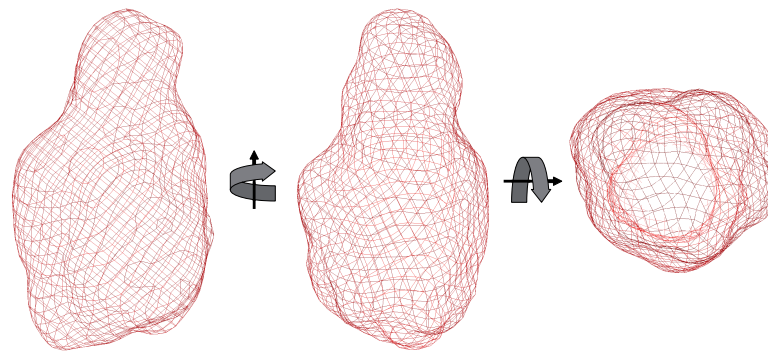
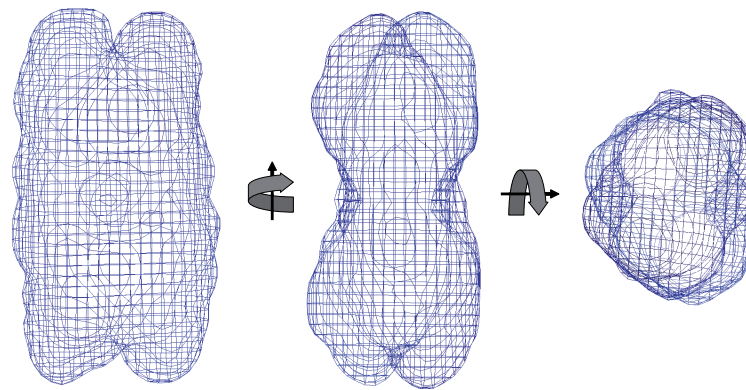


Abbildung 3.26: Modell des globulären His₆YscM2_{BT1B} Monomers. Die Erstellung des Modells basiert auf den experimentell ermittelten Streukurven für das His₆YscM2_{BT1B} Protein in Lösung. Die *ab initio* Modellierung der Hülle erfolgte unter Verwendung des ATSAS Datenpakets [56]. Die Streukurven wurden am DESY Hamburg aufgenommen. Die Drehachsen dienen der Visualisierung der räumlichen Struktur und sind jeweils um 90 ° gedreht. Die Darstellung wurde mit einer speziellen EMBL-eigenen Version der RasWin Software (Version 2.4.7) erzeugt.

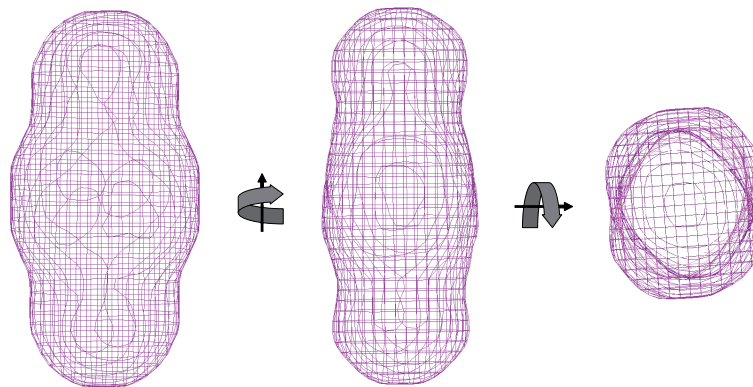
ist diese Darstellung unter Vorbehalt zu betrachten, da sich die Größe des monomeren His₆YscM2_{BT1B} Moleküls mit seinen 13 kDa an der unteren Auflösungsgrenze dieser Methode bewegt. Ebenfalls kann die Qualität des Modells durch den Vergleich mit einer hochauflösenden Kristallstruktur des YscM2 Proteins nicht untermauert werden, da eine solche Struktur des YscM2 allein bisher nicht bestimmt wurde. Aus der Literatur ist zwar eine Kokristallisierung von SycH und YscM2 bekannt, diese beinhaltet aber nur ein komplett entfaltetes Fragment des YscM2 Proteins, welches lediglich die Aminosäurereste 33 bis 81 umfasste. Was für die Korrektheit des Modells spricht, sind die aus den Streukurven ermittelten Werte für das Molekulargewicht, das mit postulierten 13 kDa dem theoretischen Molekulargewicht von 13.7 kDa recht nahe kommt.

Da sich das His₆YscM2_{BT2-5} Protein in zwei stabile Populationen aufspaltet, erwies sich das Protein als zu polydispers. Somit ergab keine der Messungen ein Modell für das His₆YscM2_{BT2-5} Protein allein und daraus folglich auch im Komplex mit SycH. Aus diesem Grund kann im Folgenden nur die Komplexierung des monodispersen His₆YscM2_{BT1B} mit SycH geschildert werden. Für die Ermittlung der Streukurven von SycH und des Gemisches aus SycH mit His₆YscM2_{BT1B} wurde ein Verhältnis von 2 : 1 (SycH zu His₆YscM2_{BT1B}) für die Messungen eingesetzt. Aus beiden Streukurven konnten unter Verwendung des ATSAS Datenpakets [56] 3D-Modelle für SycH und den Komplex berechnet werden. Betrachtet man sich die

Gestalt der Moleküle in der Abbildung 3.27 a und b, fällt zunächst auf, dass sowohl das SycH-Tetramer als auch der Komplex aus SycH und His₆YscM2_{BT1B} in etwa gleich groß sind.



(a)



(b)

Abbildung 3.27: Dreidimensionale Darstellung der Molekülhülle von SycH (a) und des Komplexes aus SycH und His₆YscM2_{BT1B} (b). Die Berechnung der Modelle erfolgte anhand der ermittelten Streukurven für SycH und für eine 2 : 1- stöchiometrische Mischung aus SycH und His₆YscM2_{BT1B}. Es wurden jeweils 1 µg/µl Protein im Grundpuffer eingesetzt. Die Modellierung erfolgte unter Verwendung des ATSAS 2.1 Datenpaketes [56]. Die Streukurven wurden am DESY Hamburg aufgenommen. Die Drehachsen dienen der Visualisierung der räumlichen Struktur und sind jeweils um 90 ° gedreht. Die Darstellung wurde mit einer speziellen EMBL-eigenen Version der RasWin Software (Version 2.4.7) erzeugt.

Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Formen der beiden Moleküle recht deutlich. Die Gestalt von SycH scheint eine etwas offenere Konformation zu besitzen (siehe Abb. 3.27a). Im Vergleich dazu ist die Hülle für den Komplex aus SycH und His₆YscM2_{BT1B} von eher kompakter bzw. abgerundeter Gestalt (siehe Abb. 3.27b). Diese Art der Kondensierung untermauern auch die experimentell ermittelten Parameter für den Gyrationradius R_g und den Moleküldurchmesser D_{max} (beide in nm). Besonders der Gyrationradius ist ein sehr sensibler Parameter für Strukturveränderungen (mündliche Kommunikation Manfred Rössle, EMBL Hamburg). Dieser beträgt für das SycH Molekül in Lösung $R_g=3.4$ nm und im Komplex $R_g=2.9$ nm. Zusätzlich fällt der berechnete Durchmesser (D_{max} in nm) der beiden Moleküle von $D_{max}=13$ nm für SycH auf $D_{max}=12$ nm des Komplexes. Da im Gegensatz zum YscM2 Protein eine Kristallstruktur von SycH (Datenbankeintrag 1TTW) bekannt war, konnten diese Informationen verwendet werden, um ein Modell der atomaren Struktur des SycH Proteins in Lösung allein und im Komplex mit His₆YscM2_{BT1B} zu berechnen. Die Röntgenkristallstruktur entspricht einem Homodimer von SycH aus *Y. pestis*, welches im Komplex mit gebundenem YscM2 Fragment aus *Y. enterocolitica* WA-314 kristallisiert wurde [76] (siehe Abb. 3.28).

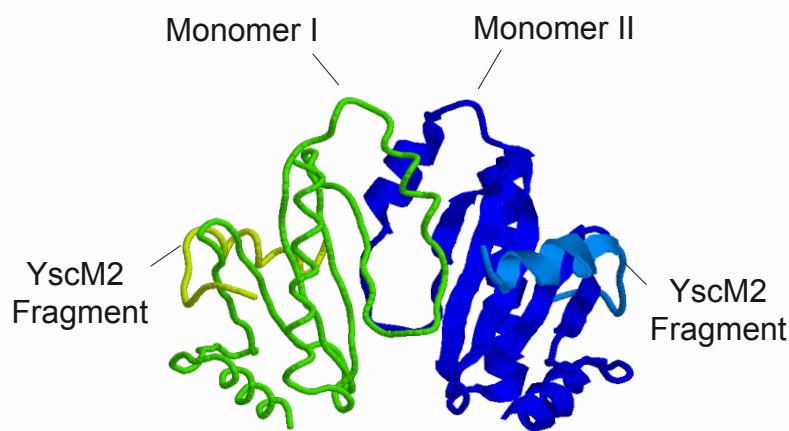
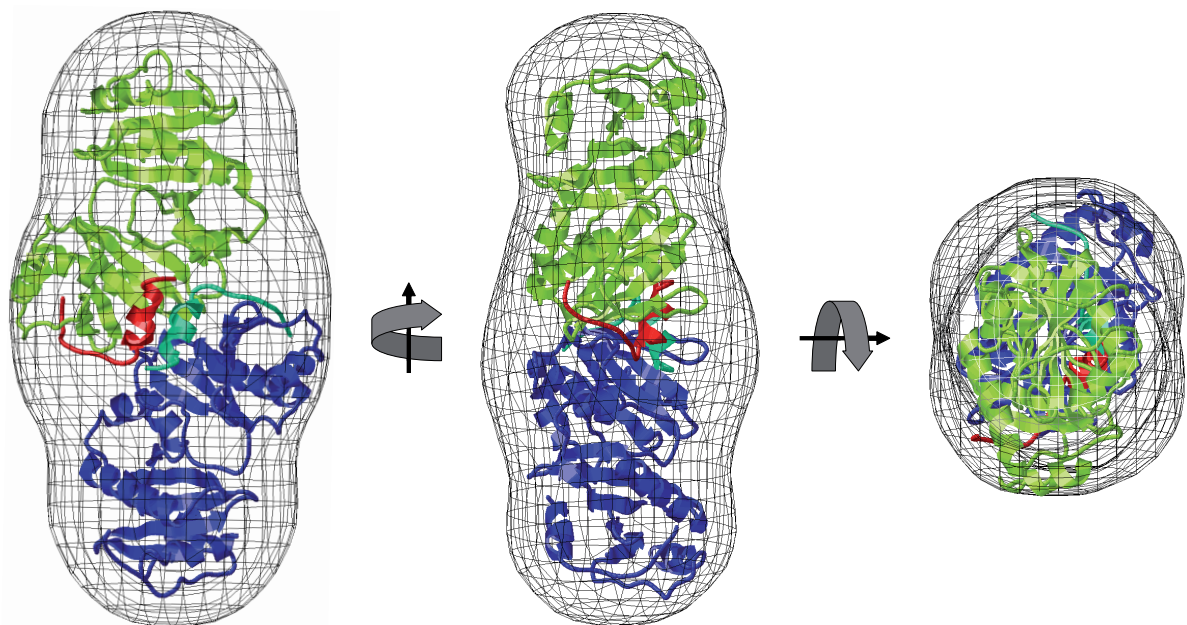


Abbildung 3.28: Die Kristallstruktur von SycH. Dargestellt ist das Homodimer des SycH-Proteins mit den gebundenen YscM2 Fragmenten entsprechend der Arbeiten von Phan *et al.* aus dem Jahr 2004. Die Koordinaten sind der PDB-Datenbank unter dem Eintrag 1TTW zu entnehmen. Die Darstellung erfolgte mit RasWin.

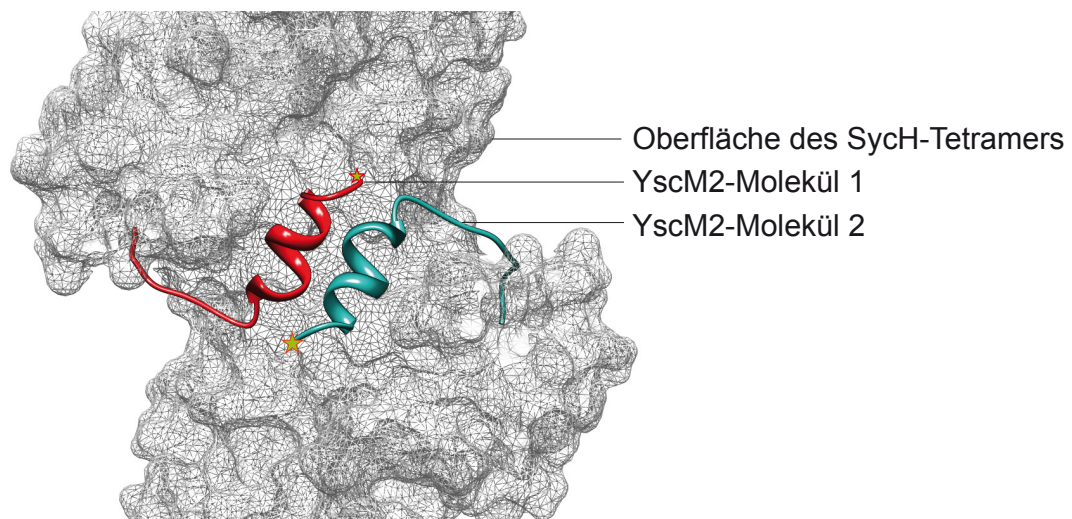
Die Informationen der hochauflösenden Kristallstruktur wurden unter Verwendung des Chrysol-Programmes [56] in die Modellierungen einbezogen. Hierbei wird die Kristallstruktur unter der Vorgabe einer bestimmten Molekül-Symmetrie neu

arrangiert. Von dieser Anordnung wurden virtuelle Streukurven generiert, welche gegen die experimentell ermittelten Streubilder der entsprechenden Moleküle gefittet wurden. Dabei stellte sich heraus, dass die Übertragung des kristallisierten SycH Homodimers in die Streukurven des SycH in Lösung, keine Übereinstimmung mit den Streukurven erbrachte. Einzig die Berechnungen basierend auf zwei SycH Homodimeren und somit die eines tetrameren SycH Proteins, ergaben verlässliche Modelle. Aus den Daten der Streukurven wurde bereits postuliert, dass sowohl SycH allein, als auch im Komplex mit His₆YscM2_{BT1B} ungefähr gleich groß sind. Somit kann man für den Komplex aus SycH und His₆YscM2_{BT1B} von einem tetrameren SycH ausgehen. Unter dieser Annahme konnte überraschenderweise die hochauflösende Struktur des SycH-YscM2₃₃₋₈₁ Kristalls von Phan *et al.* [76] nahezu perfekt in die 3D-Modelle des SycH-His₆YscM2_{BT1B} Komplexes gefittet werden. Die Abbildung 3.29a stellt das daraus resultierende atomare Modell (Abb. 3.29a, farbige Strukturen) innerhalb der modellierten Hülle (Abb. 3.29a) grafisch dar. Dabei erkennt man die beiden dimeren Untereinheiten des SycH-Tetramers (Abb. 3.29a, grüne und blaue Untereinheiten), welche aus der gegenseitigen Neuausrichtung zweier SycH Dimere entstanden. Durch die Ausrichtung der beiden Kristalle zueinander entsteht ein neues, bisher unbekanntes Interface zwischen den Molekülen, welches interessanterweise die beiden gebundenen YscM2 Fragmente zueinander ausrichtet (siehe Abb. 3.29a, blaue und dunkelgrüne Helices). Diese YscM2 Fragmente treten hier in Erscheinung, da diese zusammen mit SycH kristallisiert wurden [76]. Zur Verdeutlichung ist dieses Interface nochmals in der Abbildung 3.29b vergrößert dargestellt. Dabei erkennt man zusätzlich die Gegenläufigkeit der beiden YscM2 Moleküle, die dazu führt, dass die beiden C-terminalen Helices das Interface bilden und die restlichen, entfalteten Anteile der YscM2 Moleküle scheinbar um die jeweiligen SycH-Dimere gewunden werden (siehe Abb. 3.29b, farbige Sterne zur Verdeutlichung der letzten Aminosäure im C-Terminus).

Zusammenfassend lässt sich aus den SAXS-Daten von SycH und des Gemisches aus SycH und His₆YscM2_{BT1B} sagen, dass das hier untersuchte SycH ein Tetramer aus zwei SycH Dimeren ist, das durch die Bindung von zwei monomeren YscM2 eine Konformationsänderung erfährt. Zusätzlich könnten die gebundenen YscM2 Proteine an der Wechselwirkung der beiden SycH-Dimere unter Ausbildung eines Interface beteiligt sein. Aus dem Vergleich der hier dargestellten Ergebnisse und den Vorarbeiten von Phan *et al.* ergibt sich eine enorme Diskrepanz. Durch die Kristallisierung des Komplexes aus SycH und YscM2 wurde durch Phan *et al.* [76] ein SycH-Dimer vorgegeben, das sich in den Analysen dieser Arbeit nicht bestätigte. Sowohl Gelfiltration, als auch Kleinwinkelstreuexperimente lassen einzig die tetramere Konformation des SycH in Lösung und gebunden im Komplex zu.



(a)



(b)

Abbildung 3.29: Berechnetes Modell zur atomaren Struktur des SycH-His₆YscM2_{BT1B} Komplexes beruhend auf den Streudaten des Komplexes in Lösung und der Kristalldaten des SycH-YscM2_{33–81} Kokristalles (PDB-Eintrag 1TTW, [76]) und das daraus resultierende Interface im komplexierten SycH Tetramer. (a) Die Modellierung erfolgte unter Verwendung des ATSAS 2.1 Datenpaketes [56]. Die Streukurven wurden am DESY Hamburg aufgenommen. Die Drehachsen dienen der Visualisierung der räumlichen Struktur und sind jeweils um 90° gedreht. Die Darstellung wurde mit einer speziellen EMBL-eigenen Version der RasWin Software (Version 2.4.7) erzeugt. (b) Darstellung des Interface zwischen den beiden SycH-Dimeren. Die SycH Dimere sind als Oberfläche dargestellt (graues Netz). Die YscM2-Peptide sind als Bänder dargestellt. Die jeweiligen C-Termini der YscM2 Peptide sind durch Sternchen gekennzeichnet. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms Chimera [74].

4. Diskussion

Yersinia enterocolitica nutzt ein plasmidales Typ-III-Sekretionssystem (T3SS), um Immunreaktionen des Wirtes zu unterdrücken [44]. Dies wird durch die Injektion einer Reihe von Effektorproteinen (*Yersinia* outer proteins, Yops) vermittelt. Dabei werden speziell Wirtszellen attackiert, die für die Vermittlung einer Immunantwort zur Verfügung stehen, wie zum Beispiel Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen und neutrophile Granulozyten [4]. Durch die Translokation der Yops werden Signalkaskaden derart beeinflusst, dass es in der Folge zur Störung des Aktin-Zytoskeletts, der Inhibierung von proinflammatorischen Prozessen und zur Induktion der Apoptose kommt. Diese Strategie ermöglicht es *Y. enterocolitica*, sich extrazellulär zu vermehren und sich im Wirtsorganismus zu verbreiten [114]. Bei der Inkubation von humanpathogenen Yersinien bei 37°C und in Anwesenheit von Calcium im Medium erfolgt die Expression der T3S-Transportmaschine, während die Expression der Yops und ihrer Chaperone unter diesen Bedingungen auf einem geringen Niveau verbleibt. Erst durch eine Verringerung des Calcium-Spiegels im Medium erfolgt die massive Expression und Sekretion der Yops in den Kulturüberstand. Dieses Phänomen wird als *low calcium response* (*lcr*) bezeichnet [60, 94, 103]. Mit dem Protein LcrQ wurde ein übergreifender Regulator in *Y. pestis* [122] und *Y. pseudotuberculosis* [82] gefunden, der diesen Anforderungen gerecht werden könnte. *Y. enterocolitica* besitzt ebenso ein homologes Protein zu LcrQ, YscM1, das sich in nur einer Aminosäure von LcrQ unterscheidet. Die Überproduktion von LcrQ in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* hat eine Repression der Transkription der *yop* Gene zur Folge. Wird *lcrQ* in *Y. pseudotuberculosis* deletiert, kommt es umgekehrt zu einer unregulierten Überproduktion der Yops und der Sekretion von YopD und LcrV bei 37°C und auch in Anwesenheit von Ca^{2+} . LcrQ selbst kann durch *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* Typ-III-abhängig sekretiert werden. [82, 103]. Eine Überproduktion von YscM1 in *Y. enterocolitica* hat ebenfalls die Blockierung der Yop-Synthese zur Folge, aber die Deletion des *yscM1* Gens zeigt nicht den bekannten Phänotyp einer *lcrQ*-Mutante in *Y. pseudotuberculosis*. Grund hierfür ist die Existenz einer zweiten Kopie des *yscM1* Gens, welche als *yscM2* bezeichnet wird. Erst die Deletion beider Gene führt zu einem Phänotypen, der dem einer *lcrQ*-Deletion in *Y. pseudotuberculosis* entspricht. Deshalb wurde für YscM1 und YscM2 eine funktionelle Redundanz postuliert [103]. YscM1 und YscM2 sind beide Substrate des T3SS, die nach Wirtszellkontakt, ko-

ordiniert durch die Wechselwirkung mit SycH, transloziert werden. Aufgrund ihrer Translokation sinken die intrazellulären Konzentrationen von YscM1 und YscM2 ab, was zur Aktivierung der Yop-Synthese führt [82, 75, 103, 20]. Beide Proteine sind auf Ebene der Aminosäuresequenz zu 57% identisch, besitzen aber unterschiedliche isoelektrische Punkte, welche für YscM1 bei 6.05 und für YscM2 bei 9.79 liegen. Neben der Funktion als Repressor der *yop*-Expression wurde für YscM1 eine inhibierende Funktion auf das Stoffwechselenzym Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) beschrieben, was die Verbindung zwischen Stoffwechsel und Virulenz darstellen könnte. Ebenso konnte eine Wechselwirkung von YscM2 mit der PEPC beschrieben werden, dennoch blieb der Nachweis einer vergleichbaren inhibitorischen Funktion wie beim YscM1 Protein aus [94]. Ein weiterer Unterschied zwischen YscM1 und YscM2 ist die Art und Weise, wie beide Proteine in das Netzwerk der Chaperone eingebunden sind. Aus einer Analyse von potentiellen Wechselwirkungspartnern konnte zunächst die essentielle Interaktion der beiden Proteine mit SycH und SycE bestätigt werden. Allerdings konnte in den Analysen auch gezeigt werden, dass nur YscM1 mit dem Chaperon SycO wechselwirkt [31] und dass alleinig YscM2 mit dem Effektor YopQ, dem Chaperon SycD und dem T3SS-Regulator TyeA interagiert [105, 119]. Die unterschiedliche Einbindung von YscM1 und YscM2 ist nochmals in der Abbildung 4.1 dargestellt und fasst den aktuellen Wissensstand bezüglich der Verknüpfung von Stoffwechsel und Virulenz über YscM1 und YscM2 zusammen.

4.1 Die Sequenzierung des *yscM2* Genes in Patientenisolaten von *Y. enterocolitica*

Von Stainier *et al.* wurde postuliert, dass das *yscM2* Gen durch eine Duplikation aus dem *yscM1* Gen entstanden ist und dass dessen zelluläre Funktion redundant zur Funktion von YscM1 ist [103]. Eine solche Kombination aus Genduplikation und funktioneller Redundanz kann sich auf Genebene auf die Stabilität des *yscM2* negativ auswirken [124]. Dies könnte dann der Fall sein, wenn nach der Verdopplung eines Gens die Entwicklung einer veränderten (*subfunctionalization*) oder neuen Funktion (*neofunctionalization*) ausbleibt. Daraufhin häufen sich Mutationen in einem der beiden Gene an, was wiederum die Struktur des Genes zerstören kann [63]. Das kann in der Folge zur Pseudogenisierung führen, was dem Verlust der eigentlichen Genfunktion gleichkommt [124].

Da aber bislang keine Informationen über die Prävalenz des *yscM2* Gens in pathogenen *Y. enterocolitica* vorhanden waren, wurde zunächst mit Hilfe einer Duplex-PCR das Vorhandensein des Gens in 140 klinischen Isolaten von *Y. enterocolitica* aus einem Einsendezeitraum von 2 Jahren untersucht, um zu erfassen, wie das *yscM2* Gen in der Spezies *Y. enterocolitica* verbreitet ist. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Stämme ein *yscM2* Gen trugen. Da dieser Befund die Stabilität des Gens

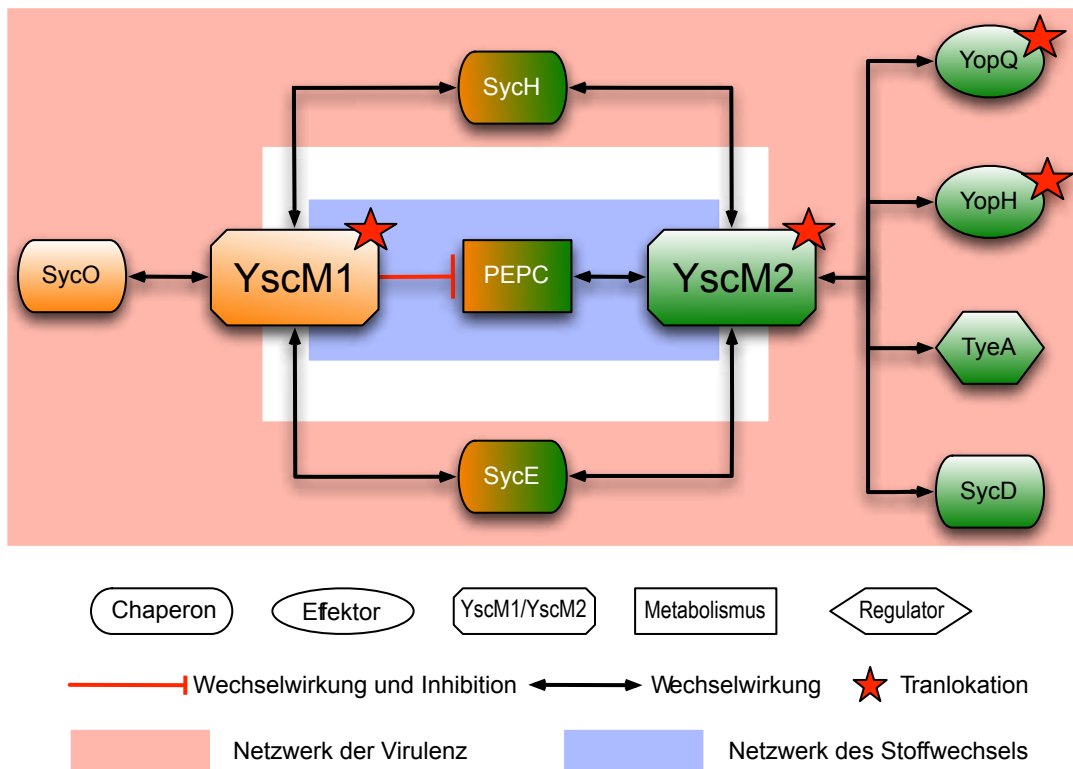


Abbildung 4.1: Flussschema zur Bedeutung von YscM1 und YscM2 für *Y. enterocolitica*. Beide Proteine sind Mediatoren zwischen Stoffwechsel und Virulenz. Dennoch ist deren direkte Einbindung in die beiden Netzwerke unterschiedlich. Während beide mit den Chaperonen SycH und SycE und dem Stoffwechselenzym PEPC interagieren, inhibiert nur YscM1 das Enzym PEPC. Die funktionelle Diversität zwischen YscM1 und YscM2 wird auch in den unterschiedlichen Wechselwirkungspartnern auf der Ebene der Virulenz ersichtlich. Hier wechselwirkt YscM2 mit TyeA, YopH, YopQ und SycD, während YscM1 mit SycO interagiert. Die Darstellung fasst die Arbeiten von Swietnicki *et al.*, Wilharm *et al.* und Schmid *et al.* zusammen [94, 105, 119].

beweist, wurde in einem nächsten Schritt die Nukleotidsequenz des *yscM2* Locus mit allen potentiellen regulatorischen Bereichen des Promotors und Terminators innerhalb eines 1 kb großen DNA Fragments in einer Sequenzierung von 32 klinischen Isolaten, die aus der Zusammenstellung des initialen PCR-*screenings* entnommen wurden, erfasst. Ein Alignment der Contigs zeigte, dass alle 32 sequenzierten *yscM2* Loci in der Nukleotidsequenz des Promotorbereiches, des Gens und des Terminators identisch zueinander waren. Somit werden alle klinischen Isolate durch eine einzige *yscM2* Gensequenz repräsentiert. Eine Schwäche dieser Studie ist, dass nicht alle bekannten Biotypen von *Y. enterocolitica* miteinbezogen wurden, da im gewählten Zeitraum zwischen 2007 und 2008 keine Biotyp 1B *Y. enterocolitica* Stämme an das Nationale Referenzzentrum für gastrointestinale Erreger gesendet wurden. Daher wurden für einen weiteren Vergleich die NCBI-Datenbank Sequenzinformationen für den *yscM2* Locus von Referenzstämmen des Biotyps 1B (*Y. enterocolitica* WA-314, *Y. enterocolitica* 8081 und *Y. enterocolitica* e127/90) und des Biotyps 2 (*Y. en-*

terocolitica W22703) mit einbezogen. Zusätzlich wurden die Sequenzen des *yscM1* Gens in dieses Alignment einbezogen, um Aussagen zu treffen, ob sich eine gleichgeartete Konservierung auch für das *yscM1* Gen erkennen ließe. Auf Grund der unterschiedlichen Lokalisierung der *yscM1* und *yscM2* Gene auf dem pYV-Plasmid und der unterschiedlichen Promotoren kann für dieses Alignment nur der offene Leserahmen der Gene betrachtet werden. Würden die unterschiedlichen *upstream* und *downstream* Bereich miteinbezogen, würde das eine Diversität vortäuschen, die nur auf der Tatsache einer unterschiedlichen Lokalisierung beruht. Als zweite Einschränkung gilt zu erwähnen, dass in dem Alignment die Proteinsequenzen der YscM1 und YscM2 Proteine betrachtet wurden, da sich so eine Pseudogenisierung anhand von Aminosäureaustauschen oder vorzeitigen Abbrüchen in der Aminosäuresequenz der Proteine ablesen lässt.

Aus dem Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen YscM1 und YscM2 lässt sich zunächst der bereits bekannte Unterschied zwischen den beiden Proteinen erkennen. Überraschenderweise spaltet sich YscM2 in zwei Sequenztypen entsprechend den Biotypen der *Y. enterocolitica* Stämme auf. Hierbei stehen sich im Gegensatz zum uniformen YscM1 das YscM2 Protein der *Y. enterocolitica* Biotypen 2 bis 5 und der Biotyp 1B Stämme gegenüber. Das YscM2 Protein von *Y. enterocolitica* besitzt somit im Gegensatz zu YscM1 einen Polymorphismus in der Aminosäuresequenz. Dieser Polymorphismus resultiert in einer Isoform des YscM2 Proteins speziell in den Biotypen 2 - 5 (YscM2_{BT2-5}) und einer YscM2 Isoform (YscM2_{BT1B}), welche nur innerhalb der *Y. enterocolitica* Biotyp 1B Stämme vorkommt. Die Polymorphismen, die für die beiden Sequenztypen verantwortlich sind, beschränken sich auf Proteinebene auf den N- und C-Terminus.

Im N-Terminus besitzt YscM2 zwei alternative Startkodons, die von den Mutationen unbeeinflusst bleiben. Somit scheint deren Bedeutung für die zelluläre Funktion so wichtig, dass diese alternativen Proteinstarts in beiden Sequenztypen konserviert bleiben. Speziell die letzten 36 Aminosäuren im C-Terminus von YscM2 sind essentiell für die negative Regulation der Yop-Synthese [20]. Und gerade dieser Bereich zeigt sich durch eine Deletion und der daraus folgenden Leserasterverschiebung am deutlichsten betroffen. Ab der Position 113 der Aminosäuresequenz sind beide Isoformen komplett unterschiedlich zu einander. Daher ist anzunehmen, dass sich dieser Umstand irgendwie in der zellulären Funktion niederschlagen müsste.

Ein Umstand, der durch diesen Ansatz nicht vollständig erfasst werden kann, ist die Genexpression der beiden *yscM2* Isoformen. Da die beiden Bereiche der Promotoren für beide Sequenztypen deckungsgleich sind lässt sich vermuten, dass die Expression in beiden Fällen in etwa gleich effizient ablaufen müsste. Wendet man aber den Blick weiter strangaufwärts, erfasst man, dass die Genloci der beiden *yscM2* Isoformen je nach Biotyp an völlig unterschiedlichen Positionen in das Virulenzplasmid integriert sind. Dabei zeigt sich nochmals ein Unterschied zwischen den Biotyp 1B Stämmen und den restlichen Stämmen der Biotypen 2 bis 5. Neueste

Sequenzierungen zeigen, dass sich im Bereich von 2 kb *upstream* des *yscM2* Gens im Biotyp 1B Stamm *Y. enterocolitica* WA-314 die Gene für die Effektoren YopO und YopP befinden [7]. Dem entgegen ist der vergleichbare Bereich im Referenzstamm des Biotyps 2 (*Y. enterocolitica* W22703) frei von Leserahmen, die auf eventuelle Proteine hinweisen könnten [100]. Die Abbildung 4.2 stellt die beiden Regionen nochmals schematisch dar. Zusätzlich befinden sich sowohl in Biotyp 1B, als auch in den Biotyp 2 - 5 Stämmen innerhalb dieses Bereiches putative Rekombinasen und vereinzelte IS-Elemente, was auf eine hohe Variabilität des *upstream* Bereiches des *yscM2* Gens hinweist. Dem zu Folge könnte je nach Biotyp der Locus von *yscM2* in ganz unterschiedliche Expressionsumgebungen eingebunden sein.

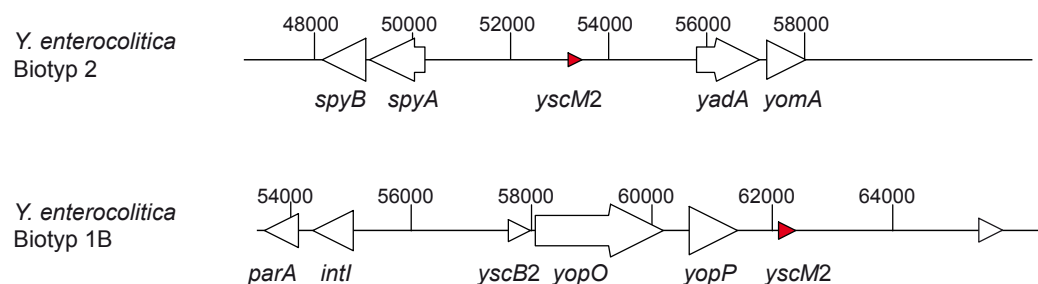


Abbildung 4.2: Lokalisation des *yscM2* Gens in Abhängigkeit des Biotypen von *Y. enterocolitica*. Schematische Darstellung der Lokalisation des *yscM2* Gens auf dem pYV-Plasmid in *Y. enterocolitica* W22703 (Biotyp 2) [100] und *Y. enterocolitica* WA-314 (Biotyp 1B) [7] Stämmen.

Um die Expressionsmuster für *yscM2*_{BT1B} und *yscM2*_{BT2-5} zu erfassen, wurde eine semi-quantitative *real time* RT-PCR für den Biotyp 1B Referenzstamm *Y. enterocolitica* 8081 etabliert. Mit Hilfe dieser PCR sollten die Expressionsprofile für die Gene *yscM1* und *yscM2* unter dem Einfluss einer Induktion der Yop-Sezernierung ermittelt werden. Um die vorläufigen Ergebnisse der Etablierung zu validieren, sollten die Expressionsprofile für *yscM1* und *yscM2* unter gleichen Bedingungen in einem zweiten Referenzstamm des identischen Biotyps (*Y. enterocolitica* WA-314) reproduziert werden. Zwar konnte eine Expression für *yscM1* und *yscM2* in beiden Stämmen nachgewiesen werden, aber speziell die Expressionsprofile für *yscM2* erbrachten im Vergleich zueinander keine reproduzierbaren Übereinstimmungen innerhalb des gleichen Biotyps. Daher soll in einem zukünftigen Projekt speziell die Frage der Expressionsmuster von *yscM2*_{BT2-5}, und *yscM2*_{BT1B} im Vergleich zum *yscM1* Gen untersucht werden.

4.2 Die Auswirkungen des Genpolymorphismus von *yscM2* auf die Proteine YscM2_{BT2-5} und YscM2_{BT1B} von *Y. enterocolitica*

Im vorangegangenen Abschnitt wurde der Nachweis der unterschiedlichen Sequenzen der beiden YscM2 Isoformen YscM2_{BT2-5} und YscM2_{BT1B} diskutiert. In diesem Abschnitt sollen nun die Auswirkungen des Sequenzpolymorphismus auf die Natur der beiden YscM2 Proteine diskutiert werden. Für diesen Zweck wurden die beiden Proteinisoformen als N-terminale Histidin-Fusionsproteine (His₆YscM2_{BT2-5} und His₆YscM2_{BT1B}) heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt. Für beide Proteine wurde zunächst das apparente Molekulargewicht mit Hilfe einer analytischen Gelfiltration bestimmt. Dabei zeigte das Elutionsprofil des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins zwei Hauptpeaks bei 28 kDa und 14 kDa. Eine anschließende Detektion des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins mit Hilfe eines Antiserums gegen YscM2 bestätigte, dass es sich in beiden Fraktionen um das His₆YscM2_{BT2-5} Protein handelte. Somit liegt das His₆YscM2_{BT2-5} Protein bei einem neutralen pH-Wert in einem Gemisch aus einem Dimer (28 kDa) und einem Monomer (14 kDa) vor. Dem entgegen eluierte das His₆YscM2_{BT1B} Protein in einem einzigen Peak bei 14 kDa, was wiederum auf eine monomere Form des His₆YscM2_{BT1B} Proteins hinweist.

Das Dimer-Monomer Gemisch des His₆YscM2_{BT2-5} und insbesondere ein monomeres His₆YscM2_{BT1B} widersprechen den Vorarbeiten von Wilharm *et al.* deutlich [120]. In der entsprechenden Publikation weist die Präparation des YscM2 Proteins aus *Y. enterocolitica* WA-314 (Biotyp 1B) auf ein homodimeres YscM2 Protein hin [120]. Obwohl die Pufferbedingungen in beiden Arbeiten nahezu identisch sind, zeigt sich das His₆YscM2_{BT1B} Protein desselben Biotypen in der vorliegenden Arbeit eindeutig als Monomer. Der wesentliche Unterschied zwischen dem Protein aus der Arbeit von Wilharm *et al.* und dem His₆YscM2_{BT1B} dieser Arbeit besteht darin, dass das von Wilharm *et al.* verwendete YscM2 über eine GST-Fusion am N-Terminus aufgereinigt wurde. Der GST-Überhang wurde anschließend enzymatisch abgespalten, wobei einige Aminosäurereste am N-Terminus verbleiben, die nicht der nativen Sequenz zugehörigen sind. Letztendlich ergeben sich abweichende N-Termini für YscM2 aus Wilharm *et al.* und His₆YscM2_{BT1B}. Schlussfolgernd könnte sich der 6×His-Tag am N-Terminus von His₆YscM2_{BT1B} destabilisierend auf das Dimer auswirken. Dem widerspricht jedoch sowohl die anteilig dimere Konformation des His₆YscM2_{BT2-5} bei identischem pH-Wert des Puffers, als auch die noch unveröffentlichten Ergebnisse von Hofmann *et al.*, die das identische Protein aus der Publikation von Wilharm *et al.* [120] ebenfalls als klares Monomer zeigen. Somit kann die unterschiedliche Oligomerisierung zwischen dem YscM2 der Publikation von Wilharm *et al.* und His₆YscM2_{BT1B} nicht auf Grund des unterschiedlichen N-Terminus erklärt werden.

Um sich einen Überblick über die dreidimensionale Gestalt der beiden YscM2 Isoformen zu verschaffen, wurde anschließend versucht mit Hilfe von Röntgenkleinwinkelstreuexperimenten (engl.: *small angle X-ray scattering*, SAXS) die Molekülstruktur aufzulösen. Dabei stellte sich heraus, dass die Lösung des His₆YscM2_{BT2-5} Proteins zu stark polydispers war, was die Berechnung eines 3D-Modells für die Molekülhülle von His₆YscM2_{BT2-5} unmöglich machte. Im Gegensatz dazu konnte für das homogenere Monomer His₆YscM2_{BT1B} eine Gestalt für die Molekülhülle berechnet werden. Die Molekülgestalt erwies sich in der Analyse als kleines globuläres Molekül. Da keinerlei hochauflösende Strukturinformationen eines intakten YscM2 des entsprechenden *Y. enterocolitica* Biotyp 1B vorhanden sind, kann an dieser Stelle allein die homologe Struktur des N-Terminus von YopH von *Y. pseudotuberculosis* [99] zur Validierung des Modells herangezogen werden. Im direkten Vergleich zeigt sich eine hohe Übereinstimmung der Kristallstruktur des N-Terminus von YopH mit dem Modell des YscM2_{BT1B} Monomers, was die Berechtigung der vorhergesagten 3D-Gestalt von YscM2_{BT1B} nochmals untermauert (siehe Abbildung 4.3).

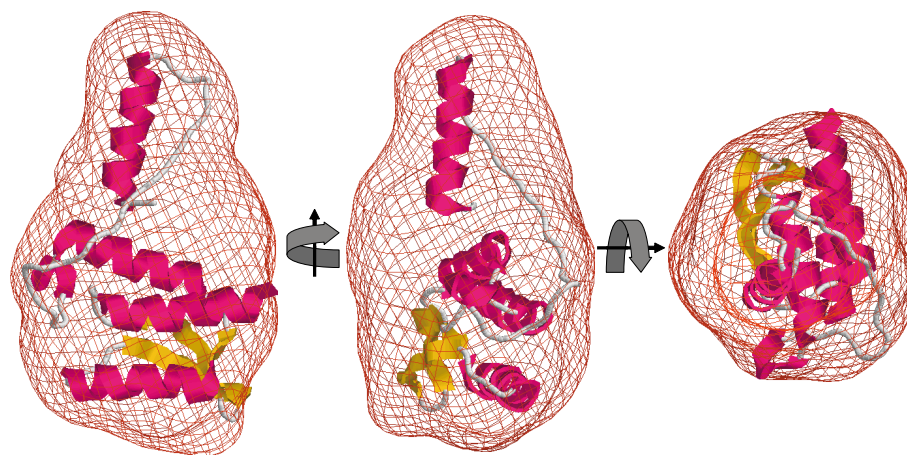


Abbildung 4.3: Modell des globulären His₆YscM2_{BT1B} Monomers und vergleichend dazu die Feinstruktur des N-Terminus von YopH [99]. Die Erstellung des Modells basiert auf den experimentell ermittelten Streukurven für das His₆YscM2_{BT1B} Protein in Lösung. Die *ab initio* Modellierung der Hülle erfolgte unter Verwendung des ATSAS Datenpakets [56]. Die Streukurven wurden am DESY Hamburg aufgenommen. Die Drehachsen dienen der Visualisierung der räumlichen Struktur und sind jeweils um 90° gedreht. Die Projektion der Feinstruktur von YopH in die berechnete Hülle von YscM2_{BT1B} erfolgte mit Hilfe einer EMBL-eigenen Version der RasWin Software (Version 2.4.7).

Die entscheidende Frage, ob nun beide YscM2 Isoformen funktionell aktiv sind, kann auf Grund des Fehlens einer enzymatischen Aktivität von YscM2 nur durch die Wechselwirkung mit einem zellulären Interaktionspartner nachgewiesen werden. Dabei eignet sich das sehr gut charakterisierte Chaperon SycH am besten. In diversen

Publikationen wurde die Wechselwirkung von SycH mit YscM2 nachgewiesen. Zum Einen ist diese Wechselwirkung essentiell für die zelluläre Funktion von YscM2 [19, 122], des Weiteren steht ein hochauflösendes Modell von SycH zur Verfügung, das auf einer Kokristallisierung von SycH aus *Y. pestis* im Komplex mit einem Fragment von YscM2 aus *Y. enterocolitica* WA-314 basiert [76]. Um diese Wechselwirkung zu untersuchen, wurde ein Tag-freies SycH nach den Vorgaben von Neumayer *et al.* hergestellt [71]. Im Zuge dieser Aufreinigung konnten 15 mg hochreines SycH von *Y. enterocolitica* WA-314 aus einem Liter Bakterienkultur gewonnen werden.

Wenn also beide Varianten des YscM2 Proteins funktionell aktiv sind, dann müssten beide in der Lage sein mit SycH zu interagieren. Und in der Tat konnte mit drei unabhängigen Methoden (SPR, analytische Gelfiltration und native PAGE) für beide YscM2 Varianten eine Interaktion mit SycH nachgewiesen werden.

Unter Verwendung der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (engl.: *surface plasmon resonance*, SPR) konnte gezeigt werden, dass SycH mit vergleichbaren Affinitätskonstanten an beide Varianten von YscM2 bindet. Durch die schnelle Assoziation und Dissoziation des SycH Proteins an beide YscM2 Isoformen zeigten die Kinetiken der Bindung von SycH Werte im μM Bereich, was auf eine transiente Protein-Protein Wechselwirkungen hinweist [64]. Biologisch macht eine transiente Wechselwirkung der YscM2 Isoformen mit SycH durchaus Sinn, da die YscM2 Proteine für die Translokation durch die T3-Nadel vom Chaperon abgekoppelt werden müssen. Hierbei ist zu erwähnen, dass die dimere Subpopulation von His₆YscM2_{BT2-5} anscheinend nicht in der Lage ist, mit SycH zu komplexieren. Dies könnte eine spezielle Funktionalität des dimeren YscM2 Proteins der Biotyp 2-5 Stämme von *Y. enterocolitica* andeuten. Wenn das Dimer nicht mit SycH wechselwirkt, kann es auch nicht dem T3SS zur Translokation zugeführt werden. Somit verbleibt das YscM2_{BT2-5} Dimer im bakteriellen Zytoplasma und könnte dort eine Funktion ausüben, während die Typ-III-Sekretion stattfindet. Dies könnte man experimentell in Sekretionsversuchen testen. Allerdings war das polyklonale Antiserum gegen YscM2 zu kreuzreaktiv, um verlässliche Aussagen über die unterschiedliche Lokalisation zwischen der monomeren und dimeren YscM2 Subpopulation zu treffen.

Eine Wechselwirkung von His₆YscM2_{BT2-5} und His₆YscM2_{BT1B} mit SycH konnte gleichermaßen mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (native PAGE) nachgewiesen werden. Dabei konnte die Entstehung eines einzigen Komplexes aus His₆YscM2_{BT1B} und SycH gezeigt werden. Im Fall der Wechselwirkung von His₆YscM2_{BT2-5} und SycH konnte ebenfalls die Interaktion nachgewiesen werden, allerdings entstehen hier drei Komplexe mit unterschiedlichem Laufverhalten. Um über die Natur dieser Komplexe zu diskutieren wurde mit Hilfe einer analytischen Gelfiltration eine Größenabschätzung der Komplexe durchgeführt.

Diese Analysen in der Gelfiltration zeigten, dass zumindest die monomere Subpopulation des His₆YscM2_{BT2-5} und das His₆YscM2_{BT1B} Monomer mit ihrem Chaperon SycH wechselwirkten. Ob die dimere Fraktion des His₆YscM2_{BT2-5} mit SycH wech-

selwirkt konnte nicht eindeutig geklärt werden, da sich der Peak des Gemisches mit dem Einzelpeak des dimeren His₆YscM2_{BT2-5} überlagern. Zusätzlich offenbarte die Gelfiltration eine Tetramerisierung von SycH. Kombiniert man die Größenabschätzungen aus der Gelfiltration mit dem Bandenmuster der nativen PAGE, können verschiedene Stöchiometrien der YscM2-SycH Komplexe in Betracht kommen. Die Tabelle 4.1 fasst potentielle Stöchiometrien für Komplexe des SycH-Tetramers mit beiden YscM2 Isoformen zusammen.

Tabelle 4.1: Mögliche Stöchiometrien der Komplexe von SycH mit His₆YscM2_{BT2-5} bzw. His₆YscM2_{BT1B}.

	Verhältnis SycH zu YscM2	Molekulargewicht
His ₆ YscM2 _{BT2-5}	4 : 2	88 kDa
	4 : 1	74 kDa
His ₆ YscM2 _{BT1B}	4 : 2	88 kDa

Aus dem Resultat, dass SycH in allen experimentellen Ansätzen als Tetramer in Erscheinung trat und gleichzeitig die maximale Größe des Komplexes aus SycH und YscM2 laut Gelfiltration und SAXS-Analysen bei 90 kDa liegen muss, können nur zwei Stöchiometrien für den suggerierten SycH-YscM2 Komplex diskutiert werden: 4 : 2 und 4 : 1. Da nur die monomeren Subpopulationen der beiden YscM2 Isoformen gebunden werden, muss das stöchiometrische Verhältnis des kleinsten Komplexes 4 : 1 betragen. Dieser Komplex hätte ein Molekulargewicht von 74 kDa. Als zweite Stöchiometrie käme ein Komplex aus einem SycH-Tetramer mit zwei Monomeren von His₆YscM2_{BT1B} bzw. His₆YscM2_{BT2-5} in Frage, was immer zu einem Molekulargewicht von 88 kDa führen müsste. Die Existenz beider Stöchiometrien wird durch eine Schulter im Elutionsprofil der Mischungen in der Gelfiltration repräsentiert. Überträgt man die Verhältnisse auf die Ergebnisse der nativen PAGE, ergibt das folgende Möglichkeiten. Die kleinste Bande in der dreier Bande des SycH-His₆YscM2_{BT2-5} Komplexes entspricht einem Verhältnis von 4 : 1, was dem kleinsten postulierten Molekulargewicht von 74 kDa entspräche (siehe Tab. 4.1). Die mittlere Bande entspräche dann folgerichtig einem Verhältnis des SycH-His₆YscM2_{BT2-5} Komplexes von 4 : 2 und einem Molekulargewicht von 88 kDa. Die dritte Bande im Gemisch aus SycH und His₆YscM2_{BT2-5} kann nicht vollständig einem festen Komplexverhältnis zugeordnet werden, da deren Molekulargewicht größer als 88 kDa sein müsste. Hierbei könnte es sich um Vielfache eines 4 : 1 oder 4 : 2 Komplexes handeln oder um unterschiedliche Konformere des Komplexes. Um dennoch die Größe der Komplexe zu erhalten sollten die Gemische mit Hilfe von EGS, Sulfo-EGS und DSP chemisch quervernetzt (engl.: *cross linking*) werden. Zwar konnten die Einzelkomponenten und die Gemische jeweils vernetzt werden, aber eine eindeutige Größenbestimmung konnte nicht erfolgen, da sich die Bandenmuster in den Gelen als zu diffus erwiesen (Daten

nicht gezeigt). Dennoch konnte bewiesen werden, dass beide Isoformen von YscM2 mit ihrem Chaperon SycH interagieren.

Somit hat *Y. enterocolitica* im Zuge seiner Evolution nachweislich für beide Isoformen von YscM2 eine zelluläre Funktion entwickelt, was die Proteine stabil in der Population erhält. Dass diese Entwicklung unabhängig vom YscM1 Protein stattfand, weist auf einen speziellen Selektionsdruck hin, der sich nur auf YscM2 auswirkt. Wie tief die Ausdifferenzierung der YscM2 Proteine ist, zeigt zum Einen deutlich die Ausbildung von zwei YscM2 Varianten in Abhängigkeit von den Biotypen, die mit einer phylogenetischen Differenzierung in die beiden *Y. enterocolitica* Subspezies zusammenfällt. Warum sich eine YscM2 Isoformen speziell für Biotyp 1B und die andere für Biotyp 2 - 5 entwickelt hat, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Relativ unwahrscheinlich ist eine ursächliche Beteiligung der jeweiligen YscM2 Isoform an der Differenzierung von *Y. enterocolitica* in hoch-pathogene Biotyp 1B und gering-pathogene Biotyp 2 - 5 *Y. enterocolitica* Stämme, da diese nach heutiger Vorstellung vor allem durch den Erwerb einer *Yersinia high pathogenicity island* (HPI) verursacht wurde [21]. Am wahrscheinlichsten begründet sich die differenzielle Anpassung der YscM2 Isoformen in den verschiedenen Biotypen durch die Überschneidung gleich dreier zellulärer Funktionen der YscM2 Proteine als Effektoren, Regulatoren und Mediatoren zwischen Virulenz und Stoffwechsel. Anscheinend erschlossen sich die gering-pathogenen Yersinien der Biotypen 2-5 andere ökologische Nischen, was einer etwas anderen Verknüpfung von Virulenz und Stoffwechsel im Vergleich zu den hoch-pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen bedurfte. Möglicherweise wird die spezielle Funktion von YscM2_{BT2-5} in den gering-pathogenen Yersinien der Biotypen 2 - 5 genutzt, um die Koordination von Stoffwechsel und Virulenz feiner zu regulieren, um sich eher als Besiedler denn als Erreger zu etablieren.

4.3 Die Oligomerisierung von SycH als Tetramer

In der Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von SycH erwies sich das Protein als Tetramer mit einem Molekulargewicht von 60 kDa. Das steht aber im Gegensatz zu den Arbeiten von Phan *et al.*, die für *Y. pestis* ein dimeres SycH Protein auf der Basis von Kristalldaten postulieren [76]. Einzig in den Arbeiten von Neumayer *et al.* wurde ein SycH-Tetramer im Zuge der Aufreinigung beschrieben [71]. Durch die Autoren wurde eine Kristallisation des SycH versucht, was auch zu einem Kristall führte, dennoch konnte kein hochauflösendes Strukturmodell ermittelt werden. Die Autoren vermuteten zwar ein homotetrameres SycH Protein, dennoch blieb ein zweiter unabhängiger Beweis für ein SycH-Tetramer bislang aus.

Diese Vorarbeiten konnten in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. Um die Ergebnisse der Gelfiltration zu bestätigen wurde die dreidimensionale Gestalt

des SycH Proteins mit Hilfe von SAXS Analysen, analog zu den Strukturanalysen der YscM2 Varianten, ermittelt. Basierend auf der ermittelten Streukurve wurde ein dreidimensionales Modell der Molekülhülle von SycH aus *Y. enterocolitica* ermittelt. Die Dimensionen dieses 3D-Modells sind nur vereinbar mit einem SycH Tetramer. Vergleicht man die Dimensionen der Molekülhülle des SycH-Tetramers mit den Dimensionen der Kristallstruktur kann ein einziges SycH-Dimer nicht in die Hülle passen (siehe Abb. 4.4 A und B). Somit stehen sowohl die Ergebnisse der Gelfiltration, als auch die Ergebnisse der SAXS-Analysen dem Ergebnis der Kristallisation des SycH Proteins von Phan *et al.* gegenüber. Die Diskrepanz zwischen beiden Strukturen ist derart groß, dass basierend auf den Streudaten des Tetramers die Feinstruktur des SycH-Dimers nicht in ein gemeinsames Modell gefittet werden konnte. Der ausschlaggebende Grund dafür war die Annahme, dass das Dimer nicht zerstört werden dürfte. Erst eine artifizielle Zerstörung des Dimers und eine komplette Neuordnung der resultierenden SycH Monomere erbrachte ein Modell, was den Dimensionen des Tetramers in Lösung in etwa entsprach (siehe Abbildung 4.4 C).

Dieses Modell macht biologisch aber keinen Sinn, da SycH zu einer Klasse von Chaperonen gehört, deren zelluläre Funktionen eine Dimerisierung voraussetzen [72, 119]. Zu dem sind von einigen anderen Vertretern dieser Klasse ebenfalls Kristallstrukturen bekannt, die der SycH Struktur im Wesentlichen entsprechen und eine Dimerisierung zeigen (siehe Abb. 1.5 der Einleitung). Der Umstand, dass die hochauflösende Struktur des SycH Kristalls nicht mit den SAXS Daten korreliert, verwundert trotzdem nicht. Die Kristallstruktur von Phan *et al.* beruht auf einer Kristallisation des Komplexes aus SycH und einem YscM2 Peptid, während die Streudaten dem unkomplexierten SycH Tetramer in Lösung entsprechen. Somit müssten im Umkehrschluss die SAXS-Daten des Komplexes aus SycH und YscM2 die Diskrepanz zwischen Kristall und SAXS-Daten auflösen.

Dazu wurden die Kleinwinkelstreudaten des Komplexes ermittelt und in ein Modell der Molekülgestalt des SycH-His₆YscM2_{BT1B} Komplexes umgesetzt. Aus dem Vergleich der beiden SAXS-Modelle für SycH allein und dem Komplex von SycH und His₆YscM2_{BT1B} konnte festgestellt werden, dass die Dimension des Komplexes dem eines SycH-Tetramers entspricht, wenn auch mit einer wesentlich gedrungeneren Gestalt (siehe vergleichend die Abb. 4.4 A für SycH und Abb. 4.5 für den Komplex).

Überraschenderweise konnte so die Diskrepanz zwischen SAXS-Daten und Kristallstruktur teilweise aufgelöst werden. Obwohl das SycH ein Tetramer bildet, kann die hochauflösende Struktur des Kristalls von Phan *et al.* nahezu perfekt auf die Streudaten des SycH-His₆YscM2_{BT1B} Komplexes gefittet werden. Der Grund dafür liegt im Wesentlichen in der veränderten Gestalt des Komplexes im Vergleich zum SycH Tetramer allein, da das SycH im Komplex wesentlich weniger Raum einnehmen muss als im Tetramer allein.

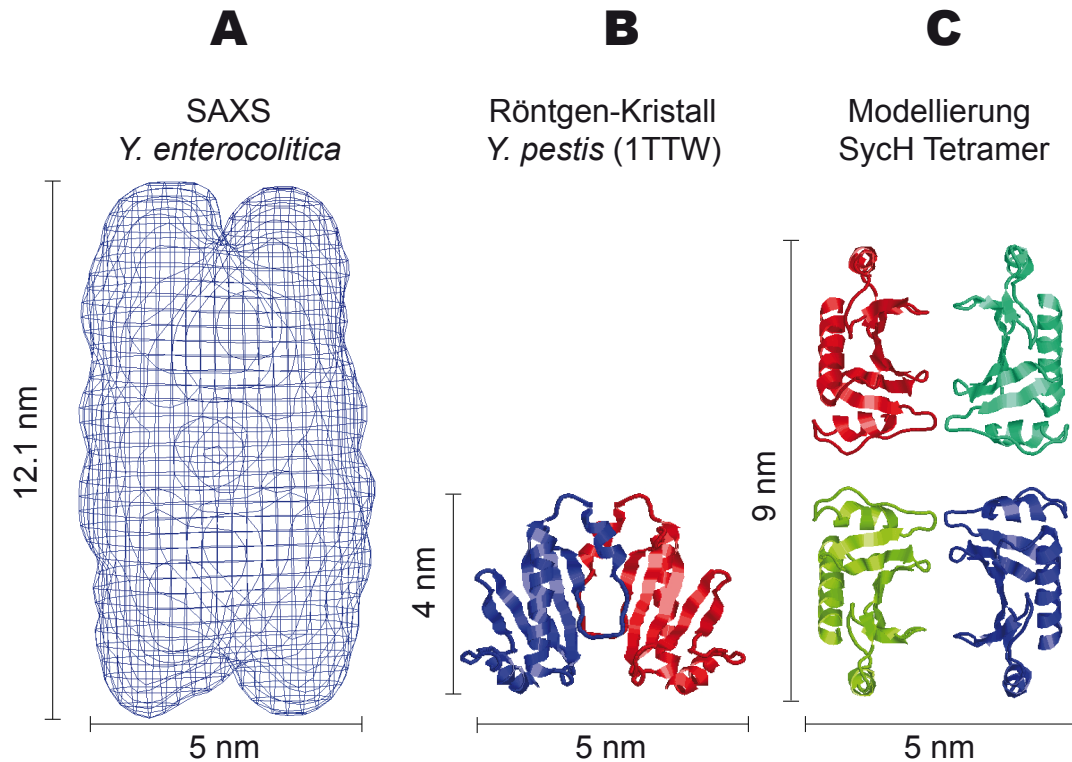


Abbildung 4.4: Vergleich der Dimensionen von SycH aus *Y. enterocolitica* in Lösung, der *Y. pestis* SycH Kristallstruktur [76] und eines Modells des SycH-Tetramers in einer Kombination der Kristall- und SAXS-Daten. Die Dimensionen wurden mit Hilfe des *Distance Tools* der RasWin Software (Version 2.4.7) ermittelt und sind in nm angegeben. Deutlich ist der Größenunterschied zwischen dem Tetramer in Lösung (A) im Vergleich zum Dimer des Kristalls zu sehen (B). Die Kombination beider Informationen führt zu einem Modell des Tetramers (C), bei dem die funktionelle Einheit, das Dimer, des SycH Chaperons zerstört werden musste. Die Modellierung erfolgte mit dem Programm Chrysol aus dem ATSAS 2.1 Datenpaket [56].

Letztendlich ermöglicht die Kombination der Streudaten des SycH-His₆YscM2_{BT1B} Komplexes und der Kristalldaten von Phan *et al.* ein vermutlich biologisch relevantes Modell der Komplexierung von SycH und YscM2, da in diesem Modell die vom SAXS vorgegebenen Dimensionen eines Tetramers erhalten bleiben und die dimere Grundstruktur von SycH, vorgegeben durch den Kristall, nicht zerstört wird (siehe Abb. 4.5). Durch die Bindung von His₆YscM2_{BT1B} kommt es vermutlich im Tetramer zu einer Neuausrichtung der SycH Dimere zueinander, was zu einer kondensierten Gesamtgestalt des Moleküls führt. Durch die Neuausrichtung der SycH Dimere im Komplex mit gebundenem YscM2 wird ein Interface zwischen den beiden SycH Dimeren gebildet, an dem das YscM2 Protein vermutlich beteiligt ist.

Dennoch erklärt dieses Modell nicht, warum speziell SycH ein Tetramer sein sollte, wenn alle anderen Vertreter derselben Chaperonklasse Dimere sind und zusätzlich die Kristallstruktur des *Y. pestis* SycH ebenfalls ein Dimer postuliert. Der Grund

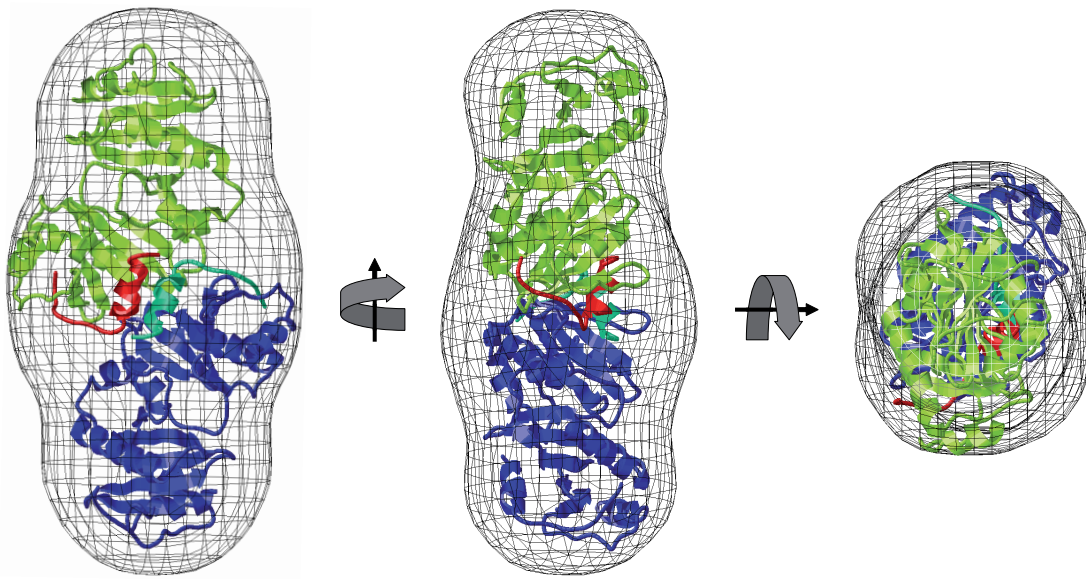


Abbildung 4.5: Dreidimensionale Darstellung der Molekülhülle von SycH im Komplex mit His₆YscM2_{BT1B}. Die Berechnung der Modelle erfolgte anhand der ermittelten Streukurven für den Komplex aus SycH und His₆YscM2_{BT1B}. Die Modellierung der Feinstruktur des Streumodells des Komplexes erfolgte mit den Daten der Kristallstruktur von Phan *et al.* [76] mit Hilfe des ATSAS 2.1 Datenpaketes [56]. Die Streukurven wurden am DESY Hamburg aufgenommen. Die Drehachsen dienen der Visualisierung der räumlichen Struktur und sind jeweils um 90 ° gedreht. Die Darstellung wurde mit einer speziellen EMBL-eigenen Version der RasWin Software (Version 2.4.7) erzeugt.

hierfür könnte in der Herkunft der Proteine liegen, die in den Arbeiten von Phan *et al.* [76] verwendet werden. Phan *et al.* diskutierten einen Ko-Kristall aus einem *Y. pestis* SycH mit einem verkürzten C-Terminus und einem Fragment von YscM2 aus *Y. enterocolitica* WA-314. Mit der Kombination eines Chaperons aus *Y. pestis* und eines Regulators aus *Y. enterocolitica* übersprangen die Autoren nicht nur die Speziesgrenzen zwischen *Y. pestis* und *Y. enterocolitica* sondern kombinierten auch zwei Proteine, die *in vivo* niemals miteinander interagieren werden, das YscM2 nicht in *Y. pestis* vorkommt. Des Weiteren könnte durch die Klonierungs-bedingte Entfernung des C-Terminus in SycH, eine wichtige Oligomerisierungsdomäne entfernt worden sein, was letztendlich die Tetramerisierung verhindern könnte.

Dass das SycH Protein der einzige tetramere Vertreter der Klasse I Chaperone sein könnte, kann darin begründet sein, dass es im Vergleich aller Chaperone dieser Klasse den längsten C-Terminus besitzt. Und eben dieser C-Terminus könnte eventuell eine wichtige Tetramerisierungsdomäne darstellen. Um diese Diskrepanz

aufzulösen, wurde das SycH-Protein von *Y. pestis* mit dem verkürzten C-Terminus, entsprechend den Vorgaben von Phan *et al.*, heterolog in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert (Ergebnisse nicht gezeigt). In der Folge soll in einer analytischen Gelfiltration das apparente Molekulargewicht dieses Proteins bestimmt werden und SAXS-Analysen sollen zu einem 3D-Modell des SycH Proteins aus den Vorarbeiten von Phan *et al.* beitragen. Dies soll letztendlich eine Dimerisierung des SycH Proteins kritisch hinterfragen.

Die SAXS-Analysen könnten auch zur Klärung eines weiteren Zusammenhanges beitragen. Das Hauptproblem in der Vorhersage der Stöchiometrie des SycH-YscM2 Komplexes lag in der Ermittlung der apparenten Molekulargewichte der Gemische von SycH und YscM2. Die hier ermittelten Unterschiede in der Gestalt des freien SycH-Tetramers und des komplexierten SycH-Tetramers könnte die Schwierigkeiten in der Interpretation der Ergebnisse der Gelfiltration erklären. Auf Grund der gedrungeneren Gestalt des Komplexes kommt es zu einem kleineren apparenten Molekulargewicht, während die offenere Gestalt des freien SycH-Tetramers zu einem größeren apparenten Molekulargewicht in der Gelfiltration führt. Die Ausbildung eines SycH-YscM2 Komplexes mit einer 4 : 2 Stöchiometrie erscheint im Einklang mit den Daten aus Gelfiltration und SAXS zu sein.

4.4 Ausblick

Da für den Polymorphismus des YscM2 Proteins in *Y. enterocolitica* keine eindeutige biologische Funktion definiert werden konnte, muss dies in zukünftigen Projekten nochmals untersucht werden.

Trotz der Polymorphismen im N-Terminus des YscM2 Proteins bleiben die beiden Startkodons unbeeinflusst. Dass diese stabil weitergegeben werden, weist auf deren Bedeutung für die zelluläre Funktion des YscM2 Proteins hin. Durch eine wechselseitige Deletion der alternativen Startkodons müssten sich funktionelle Unterschiede finden lassen, die deren Bedeutung definieren. Beide Kodons könnten zum Beispiel in unterschiedlichen Stadien der Virulenzausprägung differentiell angesprochen werden, was entweder in einer unterschiedlichen Lokalisierung, Stabilität oder Funktionalität des Proteins resultiert. Ein Aspekt, der sich direkt aus dieser Arbeit ergibt, ist die Notwendigkeit, sich der differentiellen Expression von *yscM2* zuzuwenden. Erfolgt die Regulation der Expression von *yscM2* gekoppelt mit der Expression von *yscM1* oder differentiell? Gibt es Unterschiede in der Expression der *yscM2* Sequenztypen? Dazu wurde bereits im Zuge dieser Arbeiten eine semi-quantitative *real time* RT-PCR entwickelt, die es in der Zukunft ermöglichen wird, die Expression der Zielgene im Vergleich zueinander zu betrachten. Dabei sollen unterschiedliche Stadien in der Infektion von Wirtszellen, genauso wie unterschiedliche Umwelteinflüsse, wie z.B. Mangelmedien und Komplexmedien, kurzkettige Fettsäuren oder Stoffwechselinter-

mediate der Wirtszellen, mit einbezogen werden.

Da noch immer keine eindeutige zelluläre Funktion von YscM2 charakterisiert werden konnte, muss hier ein Fortschritt erfolgen, der der offensichtlichen *moonlighting* Funktion, also der Multifunktionalität des YscM2 Proteins, Rechnung trägt. Dafür sollen in einem *yscM1*-Deletionsstamm von *Y. enterocolitica* die Auswirkungen eines dimeren bzw. monomeren YscM2 Proteins auf zelluläre Funktionen wie Stoffwechsel und *yop* Expression getestet werden. Hierfür muss zunächst die Deletion des *yscM1* Gens in einem *Y. enterocolitica* Biotyp 2 Stamm erfolgen. Weiter sollen einzelne Kodons im *yscM2* Gen durch ortsspezifische Mutagenese derart verändert werden, dass es zur Verschiebung innerhalb des Monomer-Dimer Gemisches von YscM2_{BT2-5} kommt, so dass ein reines YscM2_{BT2-5} Dimer bzw. YscM2_{BT2-5} Monomer entstehen kann. Trägt zum Beispiel alleinig ein monomeres YscM2_{BT2-5} zur Regulation der *yop* Expression bei, würde dies in einem *Y. enterocolitica* Stamm, der nur ein YscM2_{BT2-5} Dimer exprimiert, zu einer Überproduktion von Yops führen.

Für das SycH Protein ergibt sich aus der vorliegenden Arbeit, dass die postulierte Tetramerisierung weiter untersucht werden muss. Dazu soll die Oligomerisierung von SycH aus weiteren *Yersinien* analog zum SycH aus dieser Arbeit ermittelt werden. Dabei steht die Charakterisierung von Aminosäureresten, die eine Tetramerisierung vermitteln, im Vordergrund. Durch eine ortsspezifische Mutagenese Strategie sollen diese Aminosäuren erfasst und modifiziert werden, um eine spezielle Tetramerisierungsdomäne zu definieren.

Literaturverzeichnis

- [1] *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, chapter 3.3.13 *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. Springer, 2006.
- [2] *Ernährungsbericht 2008*. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V., 2008.
- [3] *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009*. Robert Koch-Institut, 2010.
- [4] M. Aepfelbacher, C. Trasak, and K. Ruckdeschel. Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb Haemost*, 98(3):521, 2007.
- [5] Y. Akeda and J.E. Galán. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, 437(7060):911–915, 2005.
- [6] A. Allaoui, R. Schulte, and G.R. Cornelis. Mutational analysis of the *Yersinia enterocolitica* *virC* operon: characterization of *yscE*, *F*, *G*, *I*, *J*, *K* required for Yop secretion and *yscH* encoding YopR. *Mol Microbiol*, 18(02):343–355, 1995.
- [7] J. Batzilla, D. Hoper, U. Antonenka, J. Heesemann, and A. Rakin. Complete genome sequence of *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleartica* serogroup O:3. *J Bacteriol*, pages JB–01484, 2011.
- [8] S. Bedoui, A. Kupz, O.L. Wijburg, A.K. Walduck, M. Rescigno, and R.A. Strugnell. Different Bacterial Pathogens, Different Strategies, Yet the Aim Is the Same: Evasion of Intestinal Dendritic Cell Recognition. *J Immun*, 184(5):2237, 2010.
- [9] N. Bhagat and J. S. Viridi. The Enigma of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. *Crit Rev Microbiol*, 2010.
- [10] S. C. Birtalan, R. M. Phillips, and P. Ghosh. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Molecular cell*, 9(5):971–980, 2002.
- [11] B. Blaylock, K.E. Riordan, D.M. Missiakas, and O. Schneewind. Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol*, 188(10):3525, 2006.

- [12] A. Blocker, N. Jouihri, E. Larquet, P. Gounon, F. Ebel, C. Parsot, P. Sansonetti, and A. Allaoui. Structure and composition of the *Shigella flexneri* needle complex, a part of its type III secreton. *Mol Microbiol*, 39(3):652–663, 2001.
- [13] E. J. Bottone. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect*, 1(4):323–333, 1999.
- [14] M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2):248–254, 1976.
- [15] I.E. Brodsky, N.W. Palm, S. Sadanand, M.B. Ryndak, F.S. Sutterwala, R.A. Flavell, J.B. Bliska, and R. Medzhitov. A *Yersinia* Effector Protein Promotes Virulence by Preventing Inflammasome Recognition of the Type III Secretion System. *Cell Host Microbe*, 7(5):376–387, 2010.
- [16] P. Burghout, F. Beckers, E. De Wit, R. Van Boxtel, G.R. Cornelis, J. Tommassen, and M. Koster. Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, 186(16):5366, 2004.
- [17] P. Burghout, R. Van Boxtel, P. Van Gelder, P. Ringler, S.A. Muller, J. Tommassen, and M. Koster. Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, 186(14):4645, 2004.
- [18] E. D. Cambronne, L. W. Cheng, and O. Schneewind. LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia yop* virulon, are injected into host cells by a chaperone-dependent mechanism. *Mol Microbiol*, 37(2):263–73, 2000.
- [19] E. D. Cambronne and O. Schneewind. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: *yscM1* and *yscM2* regulate *yop* gene expression by a posttranscriptional mechanism that targets the 5' untranslated region of *yop* mRNA. *J Bacteriol*, 184(21):5880–93, 2002.
- [20] E. D. Cambronne, J. A. Sorg, and O. Schneewind. Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector *yop* expression in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, 186(3):829–41, 2004.
- [21] E. Carniel. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect*, 3(7):561–569, 2001.
- [22] R. Chenna, H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, and J. D. Thompson. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res*, 31(13):3497–500, 2003.

- [23] B. China, M.P. Sory, BT N'guyen, M. De Bruyere, and GR Cornelis. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect Immun*, 61(8):3129, 1993.
- [24] G. Churchward, D. Belin, and Y. Nagamine. A pSC101-derived plasmid which shows no sequence homology to other commonly used cloning vectors. *Gene*, 31(1-3):165–171, Nov 1984.
- [25] G. R. Cornelis. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*, 4(11):811–25, 2006. C.
- [26] G. R. Cornelis and C. Colson. Restriction of DNA in *Yersinia enterocolitica* Detected Recipient Ability for a Derepressed R Factor from *Escherichia coli*. *Microbiology*, 87(2):285, 1975.
- [27] G.R. Cornelis. The *Yersinia* Ysc–Yop Type III weaponry. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 3(10):742–754, 2002.
- [28] G.R. Cornelis. Yersinia type III secretion: send in effectors. *The Journal of Cell Biology*, 158(3):401–408, 2002.
- [29] G.R. Cornelis. How Yops find their way out of *Yersinia*. *Mol Microbiol*, 50(4):1091–1094, 2003.
- [30] J.B. Day, I. Guller, and G.V. Plano. *Yersinia pestis* YscG protein is a Syc-like chaperone that directly binds *yscE*. *Infect Immun*, 68(11):6466, 2000.
- [31] S. Dittmann, A. Schmid, S. Richter, K. Trulzsch, J. Heesemann, and G. Wilharm. The *Yersinia enterocolitica* type three secretion chaperone SycO is integrated into the Yop regulatory network and binds to the Yop secretion protein YscM1. *BMC Microbiol*, 7:67, 2007.
- [32] Y. El Tahir and M. Skurnik. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol*, 291(3):209–218, 2001.
- [33] A.G. Evdokimov, D.E. Anderson, K.M. Routzahn, and D.S. Waugh. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit1. *J Mol Biol*, 312(4):807–821, 2001.
- [34] A.G. Evdokimov, J.E. Tropea, K.M. Routzahn, and D.S. Waugh. Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from *Yersinia pestis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58(3):398–406, 2002.
- [35] W. Frederiksen. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (bacterium enterocoliticum and pasteurella x). *Proceedings of the XIV Scandinavian Congress of Pathology and Microbiology*, Oslo, 103, 1964.

- [36] M. Fredriksson-Ahomaa, A. Stolle, and H. Korkeala. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 47(3):315–329, 2006.
- [37] J. T. Garcia, F. Ferracci, M. W. Jackson, S. S. Joseph, I. Pattis, L. R. Plano, W. Fischer, and G. V. Plano. Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems by using a 13-residue phosphorylatable glycogen synthase kinase tag. *Infect Immun*, 74(10):5645–57, 2006.
- [38] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*, pages 571–607, 2005.
- [39] G. A. Grassl, E. Bohn, Y. Müller, O. T. Bühler, and I. B. Autenrieth. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int J Med Microbiol*, 293(1):41 – 54, 2003.
- [40] Schulz F. Suerbaum S. Hahn H., Kaufmann H. E., editor. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Medizin Verlag, 2009.
- [41] D. Hanahan. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4):557–580, 1983.
- [42] D. K. Hawley and W. R. McClure. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 11(8):2237–2255, Apr 1983.
- [43] J. Heesemann and R. Laufs. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J Bacteriol*, 155(2):761–7, 1983.
- [44] J. Heesemann, A. Sing, and K. Trülsch. *Yersinia*’s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol*, 9(1):55–61, 2006.
- [45] J. Heukeshoven and R. Dernick. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6(3):103–112, 1985.
- [46] Doerries R. Hof H. *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, 2005.
- [47] E. Hoiczky and G. Blobel. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8):4669, 2001.
- [48] S. L. Howard, M. W. Gaunt, J. Hinds, A. A. Witney, R. Stabler, and B. W. Wren. Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *J Bacteriol*, 188(10):3645–3653, 2006.

- [49] G.R. Iriarte, M. und Cornelis. *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*. American Society of Microbiology, Washington, D.C., 1999.
- [50] M. Iriarte and G.R. Cornelis. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol*, 29(3):915–929, 1998.
- [51] M.W. Jackson and G.V. Plano. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS microbiology letters*, 186(1):85–90, 2000.
- [52] L. Journet, C. Agrain, P. Broz, and G.R. Cornelis. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science*, 302(5651):1757, 2003.
- [53] S. Kastilan. Einst half nur Doktor Schnabel. *Frankfurter Allgemeine Zeitung, Online Ausgabe*, 2010.
- [54] E.J. Kerschen, D.A. Cohen, A.M. Kaplan, and S.C. Straley. The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect Immun*, 72(8):4589, 2004.
- [55] Robert Koch-Institute. Fallbericht: Enteritis durch *Yersinia enterocolitica* serogruppe O:8, biovar 1B. *Epidemiol. Bull.*, 27:221–222, 2002.
- [56] P. V. Konarev, M. V. Petoukhov, V. V. Volkov, and Dmitri I. Svergun. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, 39(2):277–286, 2006.
- [57] S. Kumar, K. Tamura, and M. Nei. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 5(2):150–163, 2004.
- [58] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- [59] A. Leclercq, L. Martin, M. L. Vergnes, N. Ounnoughene, J. F. Laran, P. Giraud, and E. Carniel. Fatal *Yersinia enterocolitica* biotype 4 serovar O:3 sepsis after red blood cell transfusion. *Transfusion*, 45(5):814–818, 2005.
- [60] V. T. Lee, S. K. Mazmanian, and O. Schneewind. A program of *Yersinia enterocolitica* type III secretion reactions is activated by specific signals. *J Bacteriol*, 183(17):4970–8, 2001.
- [61] M. Letzelter, I. Sorg, L.J. Mota, S. Meyer, J. Stalder, M. Feldman, M. Kuhn, I. Callebaut, and G.R. Cornelis. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J*, 25(13):3223–3233, 2006.

- [62] M. Locher, B. Lehnert, K. Krauss, J. Heesemann, M. Groll, and G. Wilharm. Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *J Biol Chem*, 280(35):31149, 2005.
- [63] M. Lynch, M. O’Hely, B. Walsh, and A. Force. The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate. *Genetics*, 159(4):1789, 2001.
- [64] J.A. Marquart. *Surface Plasmon Resonance and Biomolecular Interaction Analysis Theory and Practice*. 2008.
- [65] T. Minamino and K. Namba. Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature*, 451(7177):485–488, 2008.
- [66] T. Morita-Ishihara, M. Ogawa, H. Sagara, M. Yoshida, E. Katayama, and C. Sasakawa. *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem*, 281(1):599, 2006.
- [67] C.A. Mueller, P. Broz, S.A. Muller, P. Ringler, F. Erne-Brand, I. Sorg, M. Kuhn, A. Engel, and G.R. Cornelis. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science*, 310(5748):674, 2005.
- [68] A. E. Murros-Kontinen, M. Fredriksson-Ahomaa, H. Korkeala, P. Johansson, R. Rahkila, and J. Bjorkroth. *Yersinia nurmii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010.
- [69] J. Naktin and K.G. Beavis. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Clin Lab Med*, 19(3):523, 1999.
- [70] L. Navarro, A. Koller, R. Nordfelth, H. Wolf-Watz, S. Taylor, and J.E. Dixon. Identification of a molecular target for the *Yersinia* protein kinase A. *Molecular cell*, 26(4):465–477, 2007.
- [71] W. Neumayer, M. Groll, V. Lehmann, U. Antoneka, S. Kahler, J. Heesemann, and G. Wilharm. *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycH. Recombinant expression, purification, characterisation, and crystallisation. *Protein Expr Purif*, 35(2):237–47, 2004.
- [72] C. Parsot, C. Hamiaux, and A. L. Page. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol*, 6(1):7–14, 2003.
- [73] J.C. Pepe and V.L. Miller. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(14):6473, 1993.

- [74] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, and T.E. Ferrin. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13):1605–1612, 2004.
- [75] J. Pettersson, R. Nordfelth, E. Dubinina, T. Bergman, M. Gustafsson, K.E. Magnusson, and H. Wolf-Watz. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science*, 273(5279):1231, 1996.
- [76] J. Phan, J. E. Tropea, and D. S. Waugh. Structure of the *Yersinia pestis* type III secretion chaperone SycH in complex with a stable fragment of YscM2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60(Pt 9):1591–9, 2004.
- [77] M. Pilhofer, A.P. Bauer, M. Schrällhammer, L. Richter, W. Ludwig, K.H. Schleifer, and G. Petroni. Characterization of bacterial operons consisting of two tubulins and a kinesin-like gene by the novel Two-Step Gene Walking method. *Nucleic Acids Res*, 35(20):e135, 2007.
- [78] D. A. Portnoy, S. L. Moseley, and S. Falkow. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect Immun*, 31(2):775, 1981.
- [79] G. Prehna, M.I. Ivanov, J.B. Bliska, and C. Stebbins. *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell*, 126(5):869–880, 2006.
- [80] K.S. Ramamurthi and O. Schneewind. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: mutational analysis of the *yopQ* secretion signal. *J Bacteriol*, 184(12):3321, 2002.
- [81] P. A. Revell and V. L. Miller. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS microbiology letters*, 205(2):159–164, 2001.
- [82] M. Rimpilainen, Å. Forsberg, and H. Wolf-Watz. A novel protein, LcrQ, involved in the low-calcium response of *Yersinia pseudotuberculosis* shows extensive homology to YopH. *J Bacteriol*, 174(10):3355, 1992.
- [83] K.E. Riordan and O. Schneewind. YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes. *Mol Microbiol*, 68(6):1485–1501, 2008.
- [84] A. Roggenkamp, N. Ackermann, C.A. Jacobi, K. Truelzsch, H. Hoffmann, and J. Heesemann. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol*, 185(13):3735, 2003.
- [85] J.R. Rohde, X. Luan, H. Rohde, J.M. Fox, and SA Minnich. The *Yersinia enterocolitica* pYV Virulence Plasmid Contains Multiple Intrinsic DNA Bends Which Melt at 37°C. *J Bacteriol*, 181(14):4198, 1999.

- [86] R. Rosqvist, Å. Forsberg, and H. Wolf-Watz. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun*, 59(12):4562, 1991.
- [87] W. Ross, S. E. Aiyar, J. Salomon, and R. L. Gourse. *Escherichia coli* promoters with UP elements of different strengths: modular structure of bacterial promoters. *J Bacteriol*, 180(20):5375–83, 1998.
- [88] S. Rozen and H. Skaletsky. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132(3):365–386, 2000.
- [89] K. Ruckdeschel, A. Deuretzbacher, and R. Haase. Crosstalk of signalling processes of innate immunity with *Yersinia* Yop effector functions. *Immunobiology*, 213(3-4):261–9, 2008.
- [90] C. Rüter, C. Buss, J. Scharnert, G. Heusipp, and MA Schmidt. A newly identified bacterial cell-penetrating peptide that reduces the transcription of pro-inflammatory cytokines. *J Cell Sci*, 123(Pt 13):2190, 2010.
- [91] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487–487, 1988.
- [92] N. Saitou and M. Nei. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4(4):406, 1987.
- [93] Marion B. Schleifstein J.I. and Coleman B. An unidentified microorganism resembling *B. ligneri* and *Pasteurella pseudotuberculosis* and pathogenic for man. *NY State J. Med.*, 39:1749–1753, 1939.
- [94] A. Schmid, W. Neumayer, K. Trulzsch, L. Israel, A. Imhof, M. Roessle, G. Sauer, S. Richter, S. Lauw, E. Eylert, W. Eisenreich, J. Heesemann, and G. Wilhelm. Cross-talk between type three secretion system and metabolism in *Yersinia*. *J Biol Chem*, 284(18):12165–77, 2009.
- [95] A. M. Schmitz and R. V. Tauxe. *Yersinia enterocolitica Infections*. Springer US, 2009.
- [96] F.D. Schubot, M.W. Jackson, K.J. Penrose, S. Cherry, J.E. Tropea, G.V. Plano, and D.S. Waugh. Three-dimensional structure of a macromolecular assembly that regulates type III secretion in *Yersinia pestis*. *J Mol Biol*, 346(4):1147–1161, 2005.
- [97] F. Shao. Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors. *Curr Opin Microbiol*, 11(1):21–29, 2008.

- [98] E. Skrzypek, T. Myers-Morales, S.W. Whiteheart, and S.C. Straley. Application of a *Saccharomyces cerevisiae* model to study requirements for trafficking of *Yersinia pestis* YopM in eucaryotic cells. *Infect Immun*, 71(2):937, 2003.
- [99] C.L. Smith, P. Khandelwal, K. Keliikuli, E.R.P. Zuiderweg, and M.A. Saper. Structure of the type III secretion and substrate-binding domain of *Yersinia* YopH phosphatase. *Mol Microbiol*, 42(4):967–979, 2001.
- [100] N. J. Snellings, M. Popek, and L. E. Lindler. Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon. *Infect Immun*, 69(7):4627–38, 2001.
- [101] M.P. Sory, A. Boland, I. Lambermont, and G.R. Cornelis. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(26):11998, 1995.
- [102] T. Spreter, C.K. Yip, S. Sanowar, I. André, T.G. Kimbrough, M. Vuckovic, R.A. Pfuetzner, W. Deng, A.C. Yu, B.B. Finlay, et al. A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nature Struct Mol Biol*, 16(5):468–476, 2009.
- [103] I. Stainier, M. Iriarte, and G. R. Cornelis. YscM1 and YscM2, two *Yersinia enterocolitica* proteins causing downregulation of yop transcription. *Mol Microbiol*, 26(4):833–43, 1997.
- [104] U.N. Streips, R.E. Yasbin, and J. Wiley. *Modern microbial genetics*. Wiley Online Library, 2002.
- [105] W. Swietnicki, S. O'Brien, K. Holman, S. Cherry, E. Brueggemann, J. E. Tropea, H. B. Hines, D. S. Waugh, and R. G. Ulrich. Novel protein-protein interactions of the *Yersinia pestis* type III secretion system elucidated with a matrix analysis by surface plasmon resonance and mass spectrometry. *J Biol Chem*, 279(37):38693–700, 2004.
- [106] S.E. Thorslund, T. Edgren, J. Pettersson, R. Nordfelth, M.E. Sellin, E. Ivanova, M.S. Francis, E.L. Isaksson, H. Wolf-Watz, M. Fällman, et al. The RACK1 Signaling Scaffold Protein Selectively Interacts with *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence Function. *PloS one*, 6(2):309–324, 2011.
- [107] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350, 1979.

- [108] C.B. Trame and D.B. McKay. Structure of the *Yersinia enterocolitica* molecular-chaperone protein SycE. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59(2):389–392, 2003.
- [109] J. E. Trosky, A. D. Liverman, and K. Orth. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol*, 2008.
- [110] K. Trulzsch, A. Roggenkamp, M. Aepfelbacher, G. Wilharm, K. Ruckdeschel, and J. Heesemann. Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int J Med Microbiol*, 293(2-3):167–77, 2003.
- [111] K. Trulzsch, T. Sporleder, E. I. Igwe, H. Russmann, and J. Heesemann. Contribution of the major secreted Yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun*, 72(9):5227–34, 2004.
- [112] P. M. Vallone and J. M. Butler. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*, 37(2):226–231, 2004.
- [113] J. C. Vanooteghem and G. R. Cornelis. Structural and functional similarities between the replication region of the *Yersinia* virulence plasmid and the RepFIIA replicons. *J Bacteriol*, 172(7):3600–3608, Jul 1990.
- [114] G.I. Viboud and J.B. Bliska. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59(1):69, 2005.
- [115] RF Wang and SR Kushner. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 100:195, 1991.
- [116] P. Wattiau, B. Bernier, P. Deslée, T. Michiels, and G.R. Cornelis. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(22):10493, 1994.
- [117] P. Wattiau and G.R. Cornells. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol Microbiol*, 8(1):123–131, 1993.
- [118] G. Wauters, K. Kandolo, and M. Janssens. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contributions to microbiology and immunology*, 9:14, 1987.
- [119] G. Wilharm, S. Dittmann, A. Schmid, and J. Heesemann. On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int J Med Microbiol*, 297(1):27–36, 2007.

- [120] G. Wilharm, W. Neumayer, and J. Heesemann. Recombinant *Yersinia enterocolitica* YscM1 and YscM2: homodimer formation and susceptibility to thrombin cleavage. *Protein Expr Purif*, 31(2):167–72, 2003.
- [121] B. W. Wren. The *Yersiniae* – a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 1(1):55–64, 2003.
- [122] C. R. Wulff-Strobel, A. W. Williams, and S. C. Straley. LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion. *Mol Microbiol*, 43(2):411–423, 2002.
- [123] C.K. Yip, T.G. Kimbrough, H.B. Felise, M. Vuckovic, N.A. Thomas, R.A. Pfuetzner, E.A. Frey, B.B. Finlay, S.I. Miller, and N.C.J. Strynadka. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature*, 435(7042):702–707, 2005.
- [124] J. Zhang. Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(6):292–298, 2003.
- [125] D.L. Zink, J.C. Feeley, J.G. Wells, C. Vanderzant, J.C. Vickery, W.D. Roof, and G.A. O'Donovan. Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*. 1980.
- [126] E. Zuckerkandl and L. Pauling. Evolutionary divergence and convergence in proteins. *Evolving genes and proteins*, pages 97–166, 1965.

Danksagung

Ich danke ganz besonders Dr. Gottfried Wilharm. Dabei bedanke ich mich nicht nur für die Möglichkeit diese Arbeit am Robert Koch-Institut zu erstellen, viel mehr danke ich Gottfried für die Zuversicht und das Vertrauen, dass er immer für meine Vorschläge und Ideen erbracht hat. Dank seiner besonderen Unterstützung konnte ich meine wissenschaftliche Ausbildung durch Besuche von internationalen Tagungen und Weiterbildungen stetig vorantreiben.

Bei Prof. Michael Steinert bedanke ich mich für die unkomplizierte Übernahme meiner Dissertation als Erstgutachter und Mentor.

Dr. Manfred Roessle danke ich für die spannenden Tage und Nächte mit DORIS und den eindrucksvollen Buildln.

Bei Evelyn Skiebe möchte ich mich für die Hilfe im Labor und die mit Abstand besten Kuchen weit und breit bedanken, genauso danke ich Julia Hofmann für die angenehme Zusammenarbeit in der Gruppe.

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern und Kollegen des Robert Koch-Institutes in Berlin und Wernigerode für den wissenschaftlichen Austausch bedanken und ganz speziell bei den Kollegen in Wernigerode, die im Laufe der Zeit zu Freunden geworden sind: Guido, Henning, Jennycita, Tiger-Jenny, Franzi-Layer, Roman, Seppi, Andreas, Ulli, Kathrin, Anne und Kevin.

Ganz persönlich möchte ich mich bei Franziska Faber bedanken, die ein wichtiger Rückhalt für mich ist und gemeinsam mit mir durch alle guten und schlechten Situationen des Lebens geht.

Meinen Eltern Regina und Heinz-Jürgen Kerrinnes gilt speziell der abschließende Abschnitt der Danksagung, da beide immer ein festes Fundament für meine persönliche Entwicklung geboten haben und mit ihrer Liebe, Zuversicht und ihrem Verständnis meinen Weg begleitet haben.